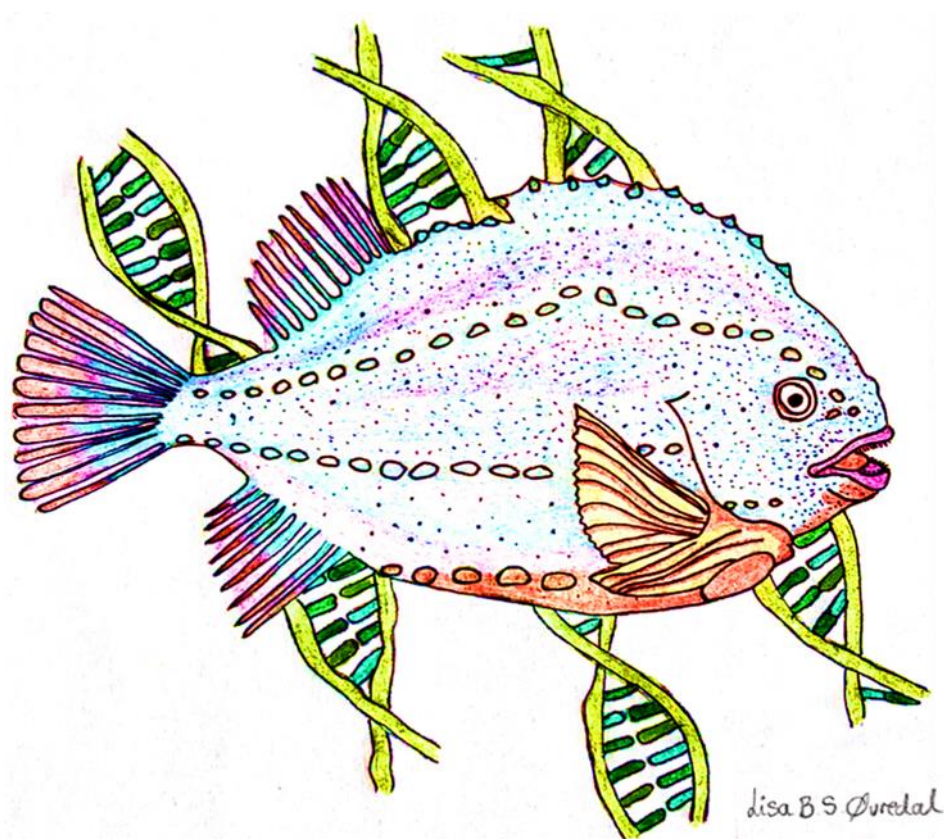


# Genetisk analyse av *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater isolert fra syk rognkjeks

Lisa Birgit Sjøstad Øvredal



Master i fiskehelse

UNIVERSITETET I BERGEN

1.juni 2019

© Forfatter

2019

Genetisk analyse av *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater  
isolert fra syk rognkjeks

Fremsidebilde er tegnet med inspirasjon fra «The Natural History of British Fishes» (1802) av  
Edward Donovan (1768-1837)

Lisa Birgit Sjøstad Øvredal

<https://bora.uib.no/>

## Sammendrag

*Vibrio anguillarum* og en *Vibrio ordalii*-lignende bakterie har de siste årene vært et økende problem hos en rekke nyere marine arter det drives oppdrett av i Norge, spesielt rognkjeks. Lite studier er gjort av populasjonsgenetikken til *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet. For å kunne utvikle effektive og gode vaksiner og for å kunne gjøre smittesporing av vibriose mulig, er det helt nødvendig å studere populasjonsgenetikken mellom isolater som forårsaker sykdom. Studier av Steinum et al. (2016) fant at det eksisterer flere ulike populasjoner innen isolater fenotypisk forenlig med *Vibrio ordalii*. Samme studie fant også at to isolater hentet fra syk torsk i Norge, som deler samme fenotypiske karakteristika med *Vibrio ordalii* fra Stillehavet, plasserer seg genetisk nærmere *Vibrio anguillarum* (Steinum et al., 2016). Derfor var det behov for analyser av flere *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet, for å kartlegge dette nærmere.

Hovedmålet med denne studien var derfor å studere populasjonsgenetikken hos en rekke *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Med spesielt fokus på hvordan *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasserer seg i forhold til *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum*.

MultiLokus Sekvens Analyse (MLSA) og MultiLokus Sekvens Typing (MLST) ble utført på åtte husholdningsgener; *atpA*, *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *rpoA*, *topA* og *pyrH* som ble sekvensert og analysert. Resultatene fra analysene viste nært slektskap mellom *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii*, samt en relativt betydelig avstand mellom *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater. *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasseres i to svært nære grupper, basert på geografi. MultiLokus Variable Nummer Tandem Repeterende Analyse (MLVA) ble også utviklet og utført. Funnene var forenlig med MLSA/MLST om *Vibrio ordalii*-lignende isolater, og gav videre en høyere oppløsning av slektskapsrelasjonen mellom isolatene i de to nære gruppene. Isolatene deles inn i 11 ulike VNTR-typer, og grupperes fortsatt etter geografiske områder. Engelske isolater grupperes for seg, og et torske-isolat-gruppers alene. Dette kan indikerte at det trolig finnes ulikheter mellom de *Vibrio ordalii*-lignende isolatene.

# Forord

Denne masteroppgaven er en del av profesjonsstudiet i fiskehelse ved Universitetet i Bergen (UiB) ved Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet. Laboratoriearbeid ble utført hos Veterinærinstituttet i Bergen.

Målet med oppgaven har vært å kartlegge populasjonsgenetikken hos *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater isolert fra hovedsakelig syk rognkjeks fra Nord-Atlanterhavsområdet.

Først vil jeg rett en stor takk til min hovedveileder, ved Veterinærinstituttet og UiB, Duncan J. Colquhoun. Tusen takk for at du alltid har vært tilgjengelig med god rådgiving, støttende ord og hjelp til enhver tid. Selv om du hovedsakelig har vært i Oslo, har du alltid vært tilgjengelig på e-post eller telefon, ved behov.

Videre vil jeg også takke alle de fantastiske ansatte på Veterinærinstituttet i Bergen. Dere har tatt imot meg med åpne armer, og jeg har virkelig ikke følt meg ensom et eneste sekund i løpet av mastertiden. Spesielt takk til Kirsten Bottolfsen som har gjort det mulig for meg å gjennomføre alt av laboratoriearbeid. Du har hatt en tålmodighet og raushet jeg har satt kjempestor pris på. Og en ekstra takk til Hanne Nilsen, som alltid har hjulpet til med ulike oppgaver underveis og vært en god diskusjonspartner når problemer har oppstått.

Jeg må også gi en stor takk til mine medveiledere Snorre Gulla og Andreas Riborg ved Veterinærinstituttet i Oslo. Dere har alltid vært tilgjengelig på både e-post og telefon når jeg har trengt bistand med kompliserte dataprogrammer og kommet med mange gode tips og råd underveis.

Tusen takk til min nydelige familie, venner og kjæreste for all støtte. Uten dere hadde ikke livet vært det samme. Og sist men ikke minst, tusen millioner takk til klasse-gjengen min, fem år har gått så utrolig fort. Uten dere fantastiske mennesker hadde jeg aldri stått her i dag med en mastergrad i hånden. Og helt til slutt en ekstra takk til deg, Even. Takk for at du har holdt ut med alle spørsmålene mine, og ikke minst for det fine samarbeidet vi har hatt gjennom hele studietiden.

# Ordforklaringer

16S rRNA - 16S (Svedberg) ribosomal ribonukleinsyre

ANI – Average nucleotide identity

*atpA* – ATP syntese A subenhet (gen)

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

bp – Basepar

DDH – DNA-DNA Hybridisering

DNA - Deoksyribonukleinsyre

Fenotype – Egenskaper som kan observeres direkte

*ftsZ* – Celledelingsprotein (gen)

Fylogenetisk tre - beskriver evolusjonære sammenhenger, dynamikk og slektskap mellom organismer

*gapA* – Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase (gen)

Genotype – Informasjonen som ligger i arvematerialet (DNA)

*gyrB* - DNA gyrase subenhet B (gen)

HGS - Helgenomsekvensering

Husholdningsgener - relativt konservert, koder for produkter essensielle for cellefunksjon

Isolat – Bakteriestamme

Mbp - Mega base pair

ML - Maximum Likelihood

MLSA – MultiLokus Sekvens Analyse

MLST – MultiLokus Sekvens Typing

MLVA – MultiLokus Variable Nummer Tandem Repeterende Analyse

MM – Master Mix

*mreB* – Stavform bestemmende protein (gen)

MST – Minimum spanning tree

NVIO/NVIB – Norges Veterinærinstitutt Oslo/Bergen

PBS - Phosphate-buffered saline

PCR – Polymerase chain reaction

*pyrH* – Uridylat kiase (gen)

*ropA* – RNA polymerase alfa subunit (gen)

ST – Sekvens type

TBE - Tris-borate-EDTA

TRS - Tandem repeterende sekvens

TRFP – Tandem Repeats Finder Program

*topA* – Topoisomerase I (gen)

VNTR – Variable Nummer Tandem Repeterende

**Definisjon:** Når *Vibrio ordalii* omtales i denne oppgaven er isolatene fra Stillehavsområdet. Når *Vibrio ordalii*-lignende isolater omtales er disse isolert fra Nord-Atlanterhavsområdet.

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	III
Forord .....	IV
Ordforklaringer .....	V
Innholdsfortegnelse .....	VI
Figur-liste.....	VIII
Tabell-liste .....	X
<b>1 Introduksjon .....</b>	<b>1</b>
1.1 Norsk akvakultur .....	1
1.2 Sykdomsbildet for oppdrettsnæringen .....	1
1.3 Lakselus – problematikk og behandling .....	2
1.4 Rensefisk .....	3
1.5 Rognkjeks .....	4
1.6 Sykdom i rognkjeks .....	5
1.6.1 Atypisk furunkulose.....	7
1.6.2 <i>Pasteurella</i> sp. ....	7
1.6.3 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> .....	8
1.6.4 <i>Moritella Viscosa</i> .....	8
1.6.5 <i>Tenacibaculum</i> spp. ....	8
1.7 Genus <i>Vibrio</i> .....	8
1.7.1 <i>Vibrio anguillarum</i> .....	9
1.7.2 <i>Vibrio ordalii</i> .....	11
1.8 Epidemiologi - bakterier .....	13
1.9 Bakteriell-typing; ulike metoder.....	14
1.10 Fenotypisk karakterisering .....	14
1.11 Den genetiske koden .....	15
1.12 Molekylærbiologiske typingsmetoder .....	16
1.12.1 Helgenomsekvensering .....	18
1.12.2 16S rRNA restriksjonsanalyser.....	19
1.12.3 Puls-Felt Gel Elektroforese.....	19
1.12.4 Husholdningsgen-analyser .....	20
1.12.5 MultiLokus Sekvens Typing (MLST).....	20
1.12.6 MultiLokus Sekvens Analyse (MLSA).....	21
1.12.7 MultiLokus Variable Nummer Tandem Repeterende Analyse (MLVA/VNTR).....	22
1.12.8 Virulensgen-analyse.....	23
1.13 Mål med studiet.....	24
<b>2 Materielt og metode.....</b>	<b>25</b>
2.1 Bakteriestammer .....	25
2.2 Mikrobank™ .....	25
2.3 Fenotypisk karakterisering .....	28
2.4 MALDI-TOF; Matrix-Assisted Laser Desorption Time Of Flight .....	29

2.5	DNA isolering (rensing) .....	29
2.6	Bestemmelse av DNA kvalitet og DNA mengde (NanoDrop) .....	30
2.7	16S rRNA sekvensering for identifikasjon .....	31
2.8	Polymerase kjedereaksjon (PCR) .....	31
2.8.1	PCR-amplifikasjon for MLSA/MLST .....	32
2.8.2	Endelig PCR-program for MLSA/MLST .....	33
2.8.3	Endelig PCR-program for MLVA .....	33
2.9	Primere .....	33
2.9.1	Primerdesign .....	34
2.9.2	Primerdesign for MLSA/MLST og Virulensgener .....	35
2.9.3	Primerdesign for MLVA .....	36
2.10	Husholdningsgener .....	37
2.11	Agarose gel-elektroforese .....	38
2.11.1	Agarose-gel-elektroforese MLSA/MLST .....	38
2.11.2	Agarose gel-elektroforese MLVA .....	39
2.12	DNA-Sekvensering .....	40
2.12.1	Sanger sekvensering .....	40
2.12.2	Sekvenseringsutførelse .....	40
2.12.3	Behandling av sekvenser .....	41
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>44</b>
3.1	Fenotyping .....	44
3.2	MALDI-TOF .....	48
3.3	16S rRNA sekvensering for identifikasjon .....	48
3.4	MLSA .....	49
3.5	MLST .....	52
3.6	MLVA .....	54
3.6.1	Resultater fra 2% Agarose gel-elektroforese .....	55
3.6.2	MLVA basert tre av <i>Vibrio ordalii</i> -lignende isolater .....	57
3.7	Virulens-gen analyse .....	58
<b>4</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>59</b>
4.1	Diskusjon av resultater .....	59
4.2	Metodologiske betraktninger .....	65
<b>5</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>67</b>
	<b>Kilder og litteratur .....</b>	<b>68</b>
	<b>Vedlegg .....</b>	<b>75</b>

# Figur-liste

Figur 1.1 - Grafen viser aktiv substans solgt antibakterielle veterinærmedisiner for terapeutisk bruk i oppdrettsfisk i Norge, fra 1981-2017, versus antall tonn oppdrettsfisk (slaktevekt) produsert (NORM/NORM-VET 2017)

Figur 1.2 - Salg av oppdrettet rensefisk (berggylt og rognkjeks) for bruk i lakselusbekjempelse, 2012-2017 Kilde: (Fiskeridirektoratet 2018)

Figur 1.3 - Rognkjeks med rund, kort kropp og tykk grønnaktig hud, dekket av rekker med beinknuter (Skiftesvik, Mortensen, and Bjelland 2015) Foto: Reidun Bjelland.

Figur 1.4 - Vekst av *Vibrio anguillarum* på blod-agar m/2% NaCl etter 2 dager ved 22°C. Foto: Lisa Øvredal

Figur 1.5 – Rognkjeks infisert med *Vibrio ordalii*. Fisken har utstående øyne (eksoftalmi) og væskefylt tarm. Foto: Jan Arne Holm, Fishguard AS

Figur 1.6 - Vekst av *Vibrio ordalii* på blod-agar m/2% NaCl etter 4 dager ved 22°C. Foto: Lisa Øvredal

Figur 1.7 - Oversikt over noen molekylærbiologiske typingsmetoder for bakterier. Figuren viser oppløsningsvevnen for ulike metoder (oransje linje) mot ulike taksonomiske nivåer. Illustrasjon: Lisa Øvredal. Inspirasjon fra Gulla 2015.

Figur 1.8 - Viser hvordan isolater i en MLSA skiller på bakgrunn av basemutasjoner. Hver svart strek i alignmentene viser en basemutasjon for hvert enkelt isolat, som er ulik fra konsensus (den sekvensen som går igjen mest). Denne informasjonen kan brukes for å konstruere fylogenetiske oversikter

Figur 2.1 - Gel-bildet fra PCR-reaksjon med temperaturgradient av fire ulike primersett (*ftsZ*, *gapA*, *ropA* og *topA*). 55°C ble valgt å bruke for alle primerpar.

Figur 2.2 - Visualisering av PCR-produkter fra agarose gel ved Gel Doc™. Oversikt over alle isolater med i oppgaven utført med *pyrH*-primer. *pyrH* skal være 589bp, som kan leses av markøren at stemmer. Siste brønn er negativ kontroll.

Figur 2.3 - Sekvenskromatogram for pluss og minus DNA-trådene for et utvalg av isolater med i oppgaven, fra programmet Geneious 11.1.5). Uthevede baser i blått er ulik fra konsensus. Gule bokser betyr at basen er endret.

Figur 3.1 – Gram-farget NVIO 9225 *Vibrio ordalii*-lignende. Bildet er tatt i lysmikroskop, forstørrelse 100x av Lisa Øvredal

Figur 3.2 – NVIO 4827 *Vibrio ordalii*. Hvit/grå farge kan skimtes. Dyrket på blod-agar 2% NaCl i 4 dager ved 22°C. Foto: Lisa Øvredal

Figur 3.3 – Gram-farget NVIO 9754 *Vibrio anguillarum*. Bildet er tatt i lysmikroskop, forstørrelse 100x av Lisa Øvredal

Figur 3.4 – NVIO 10869 *Vibrio ordalii*-lignende dyrket på blod-agar 2% NaCl i 4 dager ved 22°C. Små, gjennomskjennelige kolonier. Foto: Lisa Øvredal

Figur 3.5 - Maximum Likelihood-tre basert på sammensatte genssekvenser av alle åtte loki (3891bp). Kimura 2 G+I valgt som beste substitusjonsmodell. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner, indikeres med verdier fra 45-99% over greiner. Treet med høyest log likelihood er vist. Skala 0,0020

Figur 3.6 - Minimum Spanning basert tre konstruert i BioNumerics 7.6. Tall mellom ST-boblene beskriver antall ulikheter mellom alleler.

Figur 3.7 - VNTR 8. Nummereringen viser ulike isolater. Nr.1-12 er isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Nr.13-29 er isolater fra Nord-Norge og Trøndelag. Hver 5. brønn er markør (1000bp-50bp). 3 ulike størrelser på DNA-båndene (3VNTR-typer)

Figur 3.8 - VNTR 12. Nummereringen viser ulike isolater. Nr.1-12 er isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Nr.13-29 er isolater fra Nord-Norge og Trøndelag. Hver 5. brønn er markør (1000bp-50bp). 3 ulike størrelser på DNA-båndene (3VNTR-typer)

Figur 3.9 - VNTR 6. Nummereringen viser ulike isolater. Nr.1-12 er isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Nr.13-29 er isolater fra Nord-Norge og Trøndelag. Hver 5. brønn er markør (1000bp-50bp). 3 ulike størrelser på DNA-båndene (3VNTR-typer)

Figur 3.10 - Minimum Spanning Tree konstruert i BioNumerics 7.6 basert på MLVA av 28 isolater. Tall mellom VNTR-typer beskriver forskjeller i DNA-fragment størrelser. VNTR-type 1-7 = Midt-Norge, Vestlandet, England. VNTR-type 8-11 = Nord-Norge og Nord-Trøndelag



*Figur 3.11 - Gel-bildet av RTX-primere og hemolysin primere, testet på to Vibrio ordalii-lignende isolater og to Vibrio anguillarum isolater. Små bånd hos Vibrio ordalii-lignende isolater for RTX er trolig primer-rester.*

*Figur 5.1 - ML tre basert på 56 sammensatte aminosyresekvenser (1297 nt) av alle åtte gener. JTT matrix-basert modell brukt som best passende substitusjonsmodell (Jones et al. 1992). Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA7 (Kumar et al. 2016). Skala 0,00020*

*Figur 5.2 – Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor 1969) av atpA-genet (516 bp) og ftsZ-genet (456 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0020(atpA)/0,0050(ftsZ)*

*Figur 5.3 - Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor 1969) av gapA-genet (483 bp) og gyrB-genet (405 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0010(gapA)/0,0020(gyrB)*

*Figur 5.4 - Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor 1969) av mreB-genet (495 bp) og pyrH-genet (399 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0020*

*Figur 5.5 - Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor 1969) av ropA-genet (744 bp) og topA-genet (393 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0010*

# Tabell-liste

*Tabell 1.1 - Forekomst av sykdommer/agens hos rognkjeks undersøkt ved Veterinærinstituttet fra 2012-2018 (Hjeltnes et al. 2019).*

*Tabell 1.2 - Oversikt over isolater og gener med i MLST analysen. Røde markører viser allelvarianter i et lokus, hvor isolatene skilles av fem baser. Hver unik variasjon i alleltyper (AT) har fått et eget nummer, merket med grønn. De to isolatene har fått tildelt sekvenstype (ST) 1 og 2, merket med blå. Resultatene kan legges inn i en software og videre danne en fylogenetisk oversikt*

*Tabell 2.1 - Oversikt over isolater inkludert i denne studien, med stammenummer, årstall, vertsfisk, geografisk opprinnelse og bakterienavn*

*Tabell 2.2 -Oversikt over sekvenser av *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum* hentet fra Steinum et al. 2016, inkludert i denne studien. Med stammenummer, vertsfisk, geografisk opprinnelse, bakterienavn og accession number*

*Tabell 2.3 - Nukleinsyre konsentrasjon og 260/280,260/230 forhold hos utvalgte templatere med i studien, før fortykning*

*Tabell 2.4 - Primere brukt til 16S rRNA sekvensering av ca. 500 bp produkt, hentet fra Suau et al. 1999:*

*Tabell 2.5 - Oversikt over M13 sekvenser festet i 3'endene til primere brukt i oppgaven*

*Tabell 2.6 - Oversikt over VNTR-primere brukt i MLVA-analysen, med primer sekvenser, amplikon størrelse og kilder*

*Tabell 2.7 - Oversikt over husholdningsgener brukt i analysene i oppgaven, beskrivelse av genfunksjon, primer navn, primersekvens, samt størrelse før og etter PCR amplifikasjon.*

*Tabell 2.8 - Program for BigDye reaksjon for PCR-produkter benyttet*

*Tabell 2.9 - Viser noen av isolatene i analysen med sekvenser for hvert av husholdningsgenene (8 stk)*

*Tabell 2.10 - Variabler i alleler for hvert isolat og hvert gen lagt inn i MLST-excelarket. ST er beregnet på bakgrunn av disse variablene. Et utvalg av stammer er med i tabellen.*

*Tabell 3.1 - Resultater av fenotypiske tester (vertikal kolonne) utført på isolatene NVIO 9225, NVIO 10593, NVIO 4827, NVIO 9754, NVIO 8458 og NVIO 10896 (horisontale kolonner).*

*Tabell 3.2 - Identifikasjon av 6 isolater det er gjort full fenotyping av, før *Vibrio ordalii* fra Norsk rognkjeks ble lagt inn i databasen til MALDI-TOF instrumentet*

*Tabell 3.3 - Identifikasjon av 6 isolater det er gjort full fenotyping av, etter at *Vibrio ordalii* fra Norge ble lagt inn i databasen til MALDI-TOF instrumentet.*

# 1 Introduksjon

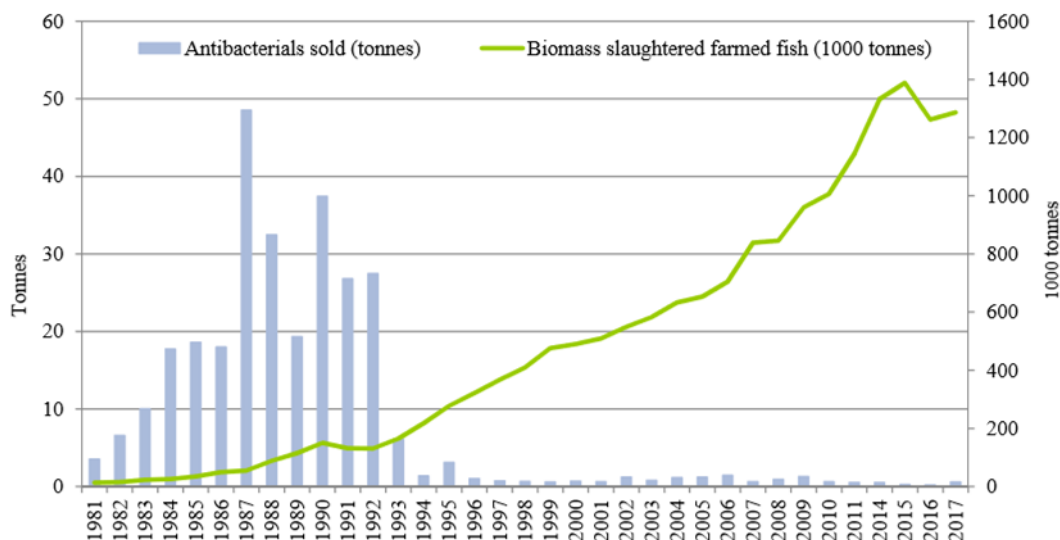
## 1.1 Norsk akvakultur

Fra 1950-60 årene og frem til i dag har norsk akvakultur hatt en svært suksessfull utvikling, med en enorm vekst og store økonomiske verdier i omløp. Til sammen har Norge eksportert sjømat, som inkluderer laks, ørret, torsk, sei og kongekrabbe, for hele 99 milliarder kroner i 2018 (Norgessjømatråd, 2019). I 2017 ble det solgt ca. 1,2 millioner tonn atlantisk laks (*Salmo salar*) til en førstehandsverdi på 61,6 milliarder norske kroner (Statistisk Sentralbyrå, 2018). Dermed utgjør oppdrett av laks den største andelen innen norsk akvakultur. Oppdrett av rognkjeks i Norge (*Cyclopterus lumpus*) utgjør den nest største andelen, i antall individer, av oppdrettsfisk. Om lag 30 millioner fisk per år blir produsert (Fiskeridirektoratet, 2019). Regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) er også en viktig art for norsk akvakultur, med en produksjon på rundt 70.000 tonn i året (SSB, 2018). Oppdrett av røye (*Salvelinus alpinus*), torsk (*Gadus morhua*), kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) og skalldyr forekommer, men i langt mindre skala (SSB, 2018). Regjeringen har satt som mål å femdoble produksjon av laks og ørret innen 2050. Selv om en rekke sykdomsutfordringer er løst ved hjelp av gode vaksiner, bedre ernæring og forebyggende tiltak som inkluderer mer skånsom behandling og mindre stress, er det likevel en rekke utfordringer innen oppdrett av fisk som må løses for at en femdobling skal være mulig. Spesielt med tanke på sykdommer som gjelder virus, bakterier og parasitter. Men også utfordringer når det gjelder fremtidig tilgang på fôr, svinn, rømming og interaksjoner med andre ville fiskebestander (Olafsen et al., 2012).

## 1.2 Sykdomsbildet for oppdrettsnæringen

Under intensiv kultivering med høy tetthet av en eller flere arter på et lite område, er det naturlig at det lettere vil oppstå helseproblemer. Smittepress av infeksiose agens mellom individer i oppdrettssammenheng vil være langt høyere enn i det naturlige habitatet (Sommerset et al., 2005). Sykdomsbildet for oppdrettsnæringen har vært utfordrende, spesielt bakterielle sykdommer som klassisk vibriose (*Vibrio anguillarum*), furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) og kaldtvannsvibriose (*Vibrio salmonicida*). Disse førte til store tap i næringen på 1980-tallet (Egidius et al., 1986, Johnsen and Jensen 1994, Sommerset et al., 2005). Som en reaksjon på dette ble det på 80-tallet tatt i bruk store mengder antibiotika, for å unngå kollaps. Innføring av effektive vaksiner på 1990-tallet kan ta mye av æren for den positive utviklingen i næringen, og er blitt det viktigste tiltaket for forebygging av sykdommer (Sommerset et al., 2005, Berg et al., 2006). Antibiotika-forbruket er i dag kraftig redusert, selv

om antall tonn oppdrettsfisk (slaktevekt) har økt betraktelig (fig. 1.1). Foreløpige tall fra VetReg viser en liten oppgang av antibiotikabruk i 2018 (ikke vist i fig. 1.1). Dette skyldes behandling av fisk i sjø infisert av *Yersinia* og *Moritella viscosa* (Hjeltnes et al., 2019).



Figur 1.1 - Grafen viser aktiv substans solgt antibakterielle veterinærmedisiner for terapeutisk bruk i oppdrettsfisk i Norge, fra 1981-2017, verus antall tonn oppdrettsfisk (slaktevekt) produsert (NORM/NORM-VET, 2017)

Likevel står næringen i dag fortsatt ovenfor utfordringer, hvor de største når det gjelder virussykdommer er pankreassykdom (PD), infeksiøs lakseanemi (ILA) og kardiomyopatisyndrom (CMS). Når det gjelder bakterielle sykdommer er det «klassisk» vintersår forårsaket av *Moritella viscosa* og «ikke klassisk» vintersår forårsaket av *Tenacibaculum*, som dominerer. Observasjoner fra felt viser at utbrudd av vintersår-bakteriene ofte oppstår i forbindelse med behandling mot lus, stress og håndtering. Det er også observert en økning av *Yersinia ruckeri* utbrudd de siste årene. Parasitter av betydning inkluderer amøbegjellesykdom (AGD) som forårsakes av den parasittiske amøben *Paramoeba perurans* (Hjeltnes et al., 2018). Men den største utfordringen for oppdrettsnæringen, når det gjelder laks og ørret, i dag er uten tvil parasitten lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*).

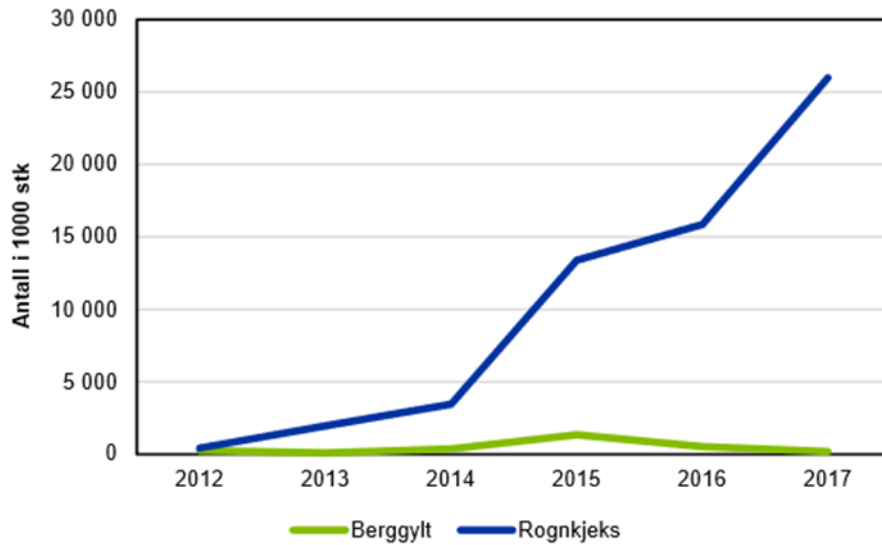
### 1.3 Lakselus – problematikk og behandling

Lakselus er en ektoparasitt som forekommer naturlig i sjøvann og finnes stort sett på hele den nordlige halvkule. Livssyklusen er tilpasset en lav vertstetthet. Den høye tettheten av verter under oppdrettsforhold har gjort at utbredelse og prevalens av lakselus har økt betraktelig. Parasitten livnæres av å spise hud, slim og blod fra salmonider, henholdsvis *Salmo*,

*Oncorhynchus* og *Salvelinus* (Torrissen et al., 2013). Beiting på dermis kan medføre sår og anemi hos den utsatte fisken. Dette kan igjen føre til sekundærinfeksjoner, økt kortisolnivå og osmoregulatoriske problemer og dødelighet (Wootton, 1992). Lakselus har derfor dratt med seg store økonomiske tap og velferdsproblemer for næringen. I kampen mot lakselus benyttes flere ulike metoder, både mekaniske, kjemoterapeutiske og andre ikke-mekaniske/kjemiske metoder. Kjemoterapeutiske metoder inkluderer tilsetning av emamektinbenzoat og flubenzuroner i fôr eller som badebehandling i form av organofosfater, hydrogenperoksid, og pyretroider. Lakselus har gradvis utviklet resistens mot disse kjemikaliene, som gir redusert behandlingseffekt (Burridge et al., 2010, Aaen et al., 2015). Derfor er det blitt et økende behov for ikke-medikamentelle behandlinger av lakselus. I nyere tid er det tatt i bruk ulike mekaniske metoder som Optilicer, Termolicer, Hydrolicer etc. Dette er metoder hvor fisken pumpes opp i et system og spyles eller børstes med temperert- eller ferskvann. Biologisk avlusning i form av rensefisk som spiser lus av fisken er en ikke-mekanisk/kjemisk metode som er blitt svært utbredt de siste årene, og har vist seg å være meget effektivt og lovende i lakselusbekjempelsen (Hjeltnes et al., 2019). Avlusningsmetoden er potensielt mindre stressende for oppdrettsfisken, den reduserer bruk av kjemoterapeutiske middel og kan være mer kostnadseffektivt enn medisiner (Powell et al., 2018). Produksjon og salg av rensefisk har utviklet seg til en betydelig næring alene (Hjeltnes et al., 2019).

## 1.4 Rensefisk

Rensefisk-arter som hovedsakelig benyttes for biologisk avlusning i norsk lakseoppdrett i dag er leppefisk-arter (*Labridae*) og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*). Leppefisk-artene som benyttes mest er grønngylt (*Symphodus melops*), berggylt (*Labrus bergylta*) og bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*). Grasgylt (*Centrolabrus exoletus*) og blåstål/rødnebb (*Labrus mixtus*) brukes i noe mindre grad (Nilsen et al., 2014). I 2017 var rensefisk tallene på henholdsvis 24 852 000 leppefisk, vill og oppdrettet, og 29 723 000 rognkjeks solgt til bruk for lakselus bekjempelse (Fiskeridirektoratet, 2019). Villfanget rensefisk har tidligere vært det vanligste å benytte, men for å verne ville bestander, redusere faren for overføring av sykdommer og i tillegg kunne avle frem mer hardfør rensefisk, samt tilfredsstille den store etterspørselen, har oppdrettet rensefisk blitt tatt i bruk i mye større grad, spesielt rognkjeks (fig.1.2) (Institute of Marine Research, 2016). I følge Kontali Analyse ble det i 2018 oppdrettet 40 millioner rognkjeks og 1,6 millioner berggylt, disse tallene er ikke med i figur 2 (Hjeltnes et al., 2019). Videre vil det fokuseres på rognkjeks, da dette er hoved-arten for analyser i denne avhandlingen.



Figur 1.2 - Salg av oppdrettet rensefisk (berggyllt og rognkjeks) for bruk i lakselusbekjempelse, 2012-2017  
Kilde: Fiskeridirektoratet 2018

## 1.5 Rognkjeks

Rognkjeks (hunn) og rognkall (hann) er en beinfisk-art i familien *Cyclopteridae*. Rognkjeks vil bli brukt videre som beskrivelse for begge kjønn. Rognkjeks lever vilt på begge sider av Nord-Atlanteren, fra Biscaya i sør til Island og det nordlige Barentshavet i nord (Davenport, 1985), med stor utbredelse langs norskekysten (Wienerroither et al., 2011). Fisken har en rund, kort kropp med tykk grønnaktig hud (Fig. 1.3). I huden langs buken og på sidene er den dekket av rekker med beinknuter. Rognkjeks mangler svømmeblære og på undersiden av fisken finnes en sugeskive fra omdannede bukfinner (Davenport and Kjørsvik, 1986). Hannen er ofte mindre enn hunnen, men utvikler større brystfinner, sugeskål og hode. Det er blitt observert rognkjeks i vill tilstand som er opp mot 14 år, men gjennomsnittlig blir den 5-8 år. Rognkjeks kan bli ca. 60 cm lang med en vekt opp mot 8 kg. Hannen blir kjønnsmoden rundt 23 cm og får en rødlig buk. Hunnen er noe større ved kjønnsmodning og beholder grønnfargen (Davenport 1985, Wienerroither et al., 2011). Rognkjeks gyter mellom februar og mai i grunt farvann, hvor hunnen kan legge opp til 220 000 egg. Det skjer en ytre befruktning av eggene, som videre voktes av hannen frem til klekking, ca. 60 dager (Goulet et al., 1986, Davenport, 1985). Ett til to år etter klekking migrerer fisken ut i det åpne hav, hvor den forblir frem til kjønnsmodning. Fisken vender tilbake for gyting i grunt vann, etter ca. 2-4 år (Wienerroither et al., 2011).



Figur 1.3 - Rognkjeks med rund, kort kropp og tykk grønnaktig hud, dekket av rekker med beinknuter (Skiftesvik et al., 2015) Foto: Reidun Bjelland.

Rognkjeks er den arten som har vist seg mest effektiv ved biologisk avlusning. Fordelen med denne fisken er at den fortsatt er aktiv ved lave sjøtemperaturer, sammenlignet med leppefiskartene som blir inaktive i kaldt vann (Skiftesvik et al., 2015, Powell et al., 2017). Rognkjeks kan dermed brukes i større geografiske områder og årstider, som er svært gunstig i norsk lakseoppdrett med lange kalde perioder, spesielt i Nord. Rognkjeks ser også ut til å være mer robust ved transport og håndtering enn leppefiskartene, samt kortere og enklere produksjonstid (Rimstad et al., 2017). All rognkjeks brukt i laksemerder i dag kommer fra oppdrett (stamfisk er fra ville bestander). Arten viser svært lovende ferdigheter som lusespiser, men er en relativt ny art å drive oppdrett av. Som for de fleste nye arter i oppdrett har også rognkjeksoppdrett utfordringer som må løses. Dette gjelder spesielt sykdomsbildet.

## 1.6 Sykdom i rognkjeks

Helse- og velferdsmessige utfordringer ved bruk av rognkjeks som rensefisk i dag er store. Selv om tiltak for bedre helse og velferd hos rensefisk generelt er satt i fokus de siste årene, kommer det frem av en spørreundersøkelse gjort fra fiskehelsepersonell og Mattilsynet utført av Veterinærinstituttet, at i underkant av 45 % av de spurte mener dødeligheten er helt lik som tidligere år. Mens 6 % mener dødeligheten har økt de siste årene (Hjeltnes et al., 2019). I undersøkelsen vektlegges spesielt dødelighet som følge av ikke-medikamentell lusebehandling, sår, finneråte, bakterielle sykdommer, håndtering, dårlig kunnskap og manglende

velferdstiltak som de mest dominerende årsaker. Det er svært viktig å tilegne seg kunnskap rundt denne fisken, om det skal være etisk riktig å bruke videre som biologisk avlusningsmetode. Problemer med sykdom og dødelighet oppstår både i settefiskfasen og etter utsett i sjø. Den utsettes for både bakterielle sykdommer, parasitter og virus (Tab.1.1). Flere ulike parasitter er påvist, og de mest alvorlige som kan føre til dødelighet er *Paramoeba perurans* (AGD), *Nucleospora cyclopteri*, *Trichodina* sp., *Ichtyobodo*, *Kudoa islandica*, *Gyrodactylus* sp./spp., *Caligus elongatus* og *Eimeria* sp. (fiskekoksidier) (Hjeltnes et al., 2019). I tillegg er et virus relativt nylig kjent fra oppdrett av rognkjeks i Norge, kjent under to navn *Cyclopterus lumpus virus* (CLuV) eller Lumpfish flavivirus (LFV). LFV er assosiert med moderat til høy dødelighet i oppdrett av rognkjeks i Norge (Rimstad et al. 2017, Brooker et al. 2018). Viralt hemoragisk septikemi virus (VHSV) er påvist hos vill rognkjeks i Skottland og Island. I Norge testes rognkjeks lite for VHSV, og er heller aldri påvist. For rognkjeks i oppdrett er det hovedsakelig bakterielle infeksjoner som har dominert sykdomsbildet. Bakteriepatogenene som har gitt størst utfordring er *Vibrio anguillarum* (vibriose), *Aeromonas salmonicida* (Atypisk furunkulose) og *Pasteurella* sp. (Pasteurellose). Også *Pseudomonas anguilliseptica* og *Vibrio ordalii* har de siste årene vist seg å være patogener for rognkjeks. *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* (klassisk furunkulose), *Moritella viscosa* (klassisk vintersår), *Tenacibaculum* spp (ikke klassisk vintersår) er også isolert fra rognkjeks. Samt ulike *Vibrio*-arter; *Vibrio splendidus*, *Allivibrio logei*, *Vibrio tapetis* og *Allivibrio wondalis*, om disse har en betydning for helse og dødelighet er usikkert (Johansen et al., 2016, Hjeltnes et al., 2019).

Tabell 1.1 - Forekomst av sykdommer/agens hos rognkjeks undersøkt ved Veterinærinstituttet fra 2012-2018 (Hjeltnes et al., 2019).

Fiskeart	Sykdom/agens	Antall positive lokaliteter per år						
		2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Rognkjeks	Atypisk <i>Aeromonas salmonicida</i>	1	8	5	51	27	24	20
	Typisk <i>Aeromonas salmonicida</i>	0	0	0	1	4	0	0
	<i>Pasteurella</i> sp.	1	16	8	14	28	23	14
	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	0	0	1	4	8	15	17
	<i>Vibro anguillarum</i>	7	6	8	12	12	7	7
	<i>Vibrio ordalii</i>	3	4	1	3	1	6	3
	AGD	0	0	2	2	8	2	4

Det er innført vaksinasjonsprogram for rognkjeks. Fisken bør ikke vaksineres før den er minimum 8 gram for best effekt (pers. kom. Eivind Isdal, Vaxxinova). Vaksiner mot *Vibrio*



*anguillarum* O1 og O2a og *Aeromonas salmonicida* subtype V og VI er de som hovedsakelig brukes i dag (pers. kom. Eivind Isdal, Vaxxinova). I tillegg er det tilgjengelige vaksiner for *Vibrio splendidus*, *Aliivibrio logei*, *Vibrio ordalii*, *Aliivibrio wodanis* og *Pseudomonas anguilliseptica* (Haugland et al., 2018). Men optimalisering av vaksiner kreves fremdeles (Rimstad et al., 2017).

Det vil først bli gjort en gjennomgang av bakterielle sykdommer hos rognkjeks i oppdrett, før bakteriene *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* blir utdypet.

### 1.6.1 Atypisk furunkulose

Atypisk furunkulose (forårsaket av atypisk *Aeromonas salmonicida*) er i dag og har lenge vært antatt å være den viktigste sykdomsfremkallende bakterielle agens hos rognkjeks etter utsett i sjø (Nilsen et al., 2014, Hjeltnes et al., 2019). Sykdommen gir ofte et kronisk infeksjonsbilde, med sår dannelse og byller, samt granulomer og mikrokolonier av bakterier i indre organer. Atypisk furunkulose kan forekomme både i settefiskfase og etter utsett i sjø (Nilsen et al., 2014, Bornø et al., 2016). Bakterien er typeinndelt, basert på forskjeller i genet som koder for overflateproteinet *vapA*, hvor det i hovedsak er vist at A-lagstype V og VI vanligvis er isolert fra rognkjeks i Norge (Brooker et al., 2018, Bornø et al., 2016). Det er et svakt tilbakefall av sykdommen de siste årene, med 24 positive lokaliteter i 2017 til 20 positive lokaliteter i 2018. Sykdommen er ikke meldepliktig, og sannsynligvis underreportert. Derfor kan nedgang i utbrudd være relatert til minkende diagnostiske undersøkelser hos VI (pers. kom. Duncan Colquhoun). *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, A-lagstype I (Gulla et al., 2016), var i 2015 og 2016 påvist hos rognkjeks på flere lokaliteter i Trøndelag, trolig fra en lokal stamme som er endemisk i villaks (Hjeltnes et al., 2018). I 2018 er ikke dette påvist hos rognkjeks av Veterinærinstituttet (Hjeltnes et al., 2019).

### 1.6.2 *Pasteurella* sp.

*Pasteurella* sp. (Pasteurellose) er også en viktig bakteriell agens hos rognkjeks både i Norge og Skottland. Bakterien ble i 2013 isolert fra 16 norske oppdrettsanlegg med rognkjeks, i forbindelse med høy dødelighet. Videre er bakterien blitt isolert jevnlig fra syk rognkjeks både i settefiskfase og etter utsett i sjø (Johansen et al., 2016). Ved infeksjon med *Pasteurella* sp. er det observert hudlesjoner som hvite flekker, blødninger ved basis av finner og i gjeller, halefinneråte og ascites. Mikrokolonier av bakterien er også funnet i indre organer som nyre, hjerte og milt (Hjeltnes et al., 2019). Sykdommen har hatt en markant nedgang fra 2017 til 2018 ifølge Veterinærinstituttets registreringer.

### 1.6.3 *Pseudomonas anguilliseptica*

*Pseudomonas anguilliseptica* er en opportunistisk bakterie, som har vist seg å være patogen for en rekke fiskearter, både kultivert og villfisk, i brakkvann, ferskvann og sjøvann (Balboa et al., 2007). Bakterien ble første gang påvist hos rognkjeks i Norge i 2011. Antall positive lokaliteter har økt de siste årene, med 17 tilfeller i 2018 (Hjeltnes et al., 2019). Hos infisert fisk kan det ofte observeres punktblødninger i hud, bukhinne og lever. Nyrene kan være svært infisert, og milten kan i noen tilfeller være forstørret (Wiklund and Bylund, 1987).

### 1.6.4 *Moritella Viscosa*

*Moritella viscosa* også kjent som «klassisk» vintersår bakterien har vært og er et stort problem i oppdrett av laks, som kan føre til økt dødelighet og nedsatt slakteverdi. Vintersår forårsaket av *Moritella viscosa* oppstår også med jevne mellomrom hos rognkjeks. Bakterien er oftest patogen ved lave sjøtemperaturer og hos rognkjeks ofte i forbindelse med sårlesjoner (Brooker et al., 2018, Hjeltnes et al., 2019).

### 1.6.5 *Tenacibaculum* spp.

*Tenacibaculum* spp. er som for all marin fisk også påvist hos rognkjeks. Det observeres sår og slitasjeskader på finner og hale. Ofte med et gult belegg i sårkant, når *Tenacibaculum* spp. er isolert (Bornø et al., 2016).

## 1.7 Genus *Vibrio*

*Vibrio* er en slekt i familien *Vibrionaceae*, bestående av en rekke ulike arter. Disse er beskrevet som gram negativ, rett eller bøyde staver, 1,4-2,6 µm lange med en tykkelse på ca. 0,5-0,8 µm. Bevegelige ved hjelp av polare flageller, fakultativ anaerobe, kjemoorganotrofe med både fermentativ og oksidativ metabolisme. *Vibrio* spp. finnes i akvatiske miljøer med et vidt spekter av saliniteter. Artene er vanlig i estuarine og marine miljøer samt tarmsystemet til marine dyr (Farmer et al., 2015). Noen arter finnes også i ferskvann (Farmer et al., 2015). *Vibrio*-assosierte sykdommer opptrer ofte ved høye vanntemperaturer og ofte i forbindelse med stressfaktorer som gjør terskel for infeksjon lavere (Larsen og Pedersen 1999). Vibriose er fellesbetegnelsen for infeksjoner forårsaket av en gruppe velkjente bakterier innenfor slekten *Vibrio*, som finnes i en rekke marine fiskearter. Eksempler på slike arter er *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Aliivibrio salmonicida*, *V.vulnificus*, *V.harveyi*, *V.splendidus*, *V.tapetis* og *V.alginolyticus* (Larsen et al. 1999). Grunnen til at noen av artene har navnet *Aliivibrio* og ikke *Vibrio* er fordi *Vibrio*-slekten ble i 2007 delt i to. Dette var på bakgrunn av analyser av *recA*, *rpoA*, *pyrH*, *gyrB* og 16S rRNA gensekvenser. Derfor er *Vibrio logei*, *Vibrio wodalii*, *Vibrio fischeri* og *Vibrio*

*salmonicida* gitt nye navn; *Aliivibrio logei*, *Allivibrio wodalis*, *Aliivibrio fischeri* og *Aliivibrio salmonicida* (Urbanczyk et al., 2007).

*V. splendidus*, *Allivibrio logei*, *V. tapetis* og *Allivibrio wodanis* er bakterier som veldig ofte isoleres fra rognkjeks når det gjøres diagnostiske undersøkelser. Helseproblemer knyttet til disse bakteriene er noe uklart (Bornø et al., 2016, Hjeltnes et al., 2019). Videre vil *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* utredes, disse forårsaker klassisk vibriose og er hovedbakterieartene i avhandlingen. Vibriose forårsaket av de to bakteriene utgjør sannsynligvis, verden over, den mest signifikante bakterielle sykdommen i oppdrettet- og vill marin fisk fra tempererte områder (Steinum et al., 2016). Spesielt har *Vibrio anguillarum* tidligere vært et problem i oppdrett av laksefisk i Nord-Atlanterhavsområdet. I dag er dette under kontroll på grunn av effektive vaksiner (Colquhoun and Lillehaug, 2014). For relativt nye oppdrettsarter av marin fisk, er situasjonen noe annerledes. Spesielt torsk og rognkjeks i Norge, Irland og Scotland har opplevd store problemer med både *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* (Steinum et al., 2016).

### 1.7.1 *Vibrio anguillarum*

*Vibrio anguillarum* er beskrevet helt tilbake til 1718 i Italia, som «rød pest» hos ål (*Anguilla anguilla*) (Blazer, 1988). Dette er uten tvil første referanse til en bakteriell fiske sykdom i europeisk litteratur (Drouin 1907, Blazer 1988). Det var ikke før i 1893 at bakterien første gang ble dyrket fra ål av forskeren Canestrini (Austin and Austin, 2007). På denne tiden ble sykdommen kalt «rød-pest» og fikk navnet *Bacterium anguillarum*. Det oppstod et lignende tilfelle i Sverige, som førte til at Bergmann i 1909 kunne beskrive *Vibrio anguillarum* offisielt som et sykdomsfremkallende patogen (Hendrie et al., 1971). Den ble beskrevet i USA i 1953, Japan i 1967 og Canada i 1970 (Larsen et al., 1999). Bakterien blir plassert i slekten *Vibrio*, men i senere tid etter sekvensering med 5S rRNA, er det foreslått klassifisering i slekten *Listonella* (MacDonell and Colwell, 1985). I dag er både *Listonella anguillarum* og *Vibrio anguillarum* godkjente artsnavn, men *Vibrio anguillarum* er mest korrekt å bruke (Thompson et al., 2011). *Vibrio anguillarum* vil bli benyttet videre i denne avhandlingen. Vibriose forårsaket av *Vibrio anguillarum*, er en opportunistisk bakterie, og er beskrevet i over 40 ulike marine fiskearter. Både i varmt - og kaldt vanns fisk, som inkluderer torsk, ørret, laks, havabbor, Japansk og Europeisk ål, flyndre og rognkjeks for å nevne noen (Toranzo et al., 2017). *Vibrio anguillarum* forårsaker klassisk vibriose og karakteriseres typisk med akutt hemoragisk septikemi og blødninger ved finnebasis, i munnregionen, ved gattet, under hud og i øyne. Fisken

mister appetitt, får mørkere pigmentering, blir inaktive og kan utvikle eksoftalmus. Bleke gjeller er også observert, som et resultat av alvorlig anemi. Store, dype sår kan ofte utvikles fra hudforandringer, som i noen tilfeller penetrerer helt inn til bukhulen. I noen tilfeller observeres utspilt buk på grunn av omfattende acites og ødem. Ved obduksjon sees ofte blødninger i alle indre organer, fettvev og muskulatur. Svullen og mørk milt, samt dilatert og væskefylt baktarm (Larsen et al., 1999, Toranzo et al., 2017). Histopatologisk sees angrep av løst bindevev, milt, nyre, baktarm, gjeller og store mengder bakterier i blodet (Larsen et al., 1999, Naka et al., 2011).

*Vibrio anguillarum* har under laboratorieforhold en optimal vekst ved 15-37 °C og krever salt i vekstmediet (Larsen et al., 1999, Toranzo et al., 2017). Bakterien vokser med relativt store hemolytiske kolonier (Fig.1.4), er positiv for arginin-reaksjon, negativ for orthinine og lysin, vibriostat-sensitiv, oksidativ og oksidase positiv (Pazos et al., 1993). Essensielle virulensmekanismer til bakterien inkluderer den polare flagellen, jernbindings mekanisme, i tillegg til produkter som proteaser og hemolysin (Larsen et al., 1999). Genomet består av to sirkulære kromosomer, Chr1 og Chr2. I tillegg har en del *Vibrio anguillarum* serotype O1 et plasmid (pJM1), som også er viktig for virulens. Chr1 er størst og står for majoriteten av essensielle gener. Genomet er tilsammen 4,2 – 4,3 Mbp, med et guanin-cytosin (GC) forhold på 43-46%. (Naka et al., 2011, Toranzo et al., 2017). Serologiske variasjoner innenfor arten er stor, og mer enn 23 O serotyper av *Vibrio anguillarum* er til nå beskrevet (O1-O23) (Sørensen and Larsen 1986, Pedersen et al., 1999). Det er kun serotypene O1, O2 og i noe mindre grad O3 som er assosiert med sykdom (Larsen et al., 1999, Toranzo et al., 2017). Serotypene O1 og O2, har en vid utbredelse både i verts-arter og geografi og er de dominerende typene. Serotype O3 rammer i hovedsak ål og ayu, kultivert i Japan og Atlantisk laks kultivert i Chile (Toranzo et al., 2017). I motsetning til serotype O1, som er en homogen gruppe, er serogruppe O2 heterogen og deles inn i undergrupper med navnene O2 $\alpha$ , O2 $\alpha$  II og O2 $\beta$  (Mikkelsen et al. 2007, Toranzo et al., 2017). I hovedsak er det serotype O1 som forårsaker sykdom i salmonider og O2 $\beta$  som forårsaker sykdom hos hovedsakelig Gadidaer (torskefamilien) (Naka et al., 2011).



Figur 1.4 - Vekst av *Vibrio anguillarum* på blod-agar m/2% NaCl etter 2 dager ved 22°C. Foto: Lisa Øvredal

### 1.7.2 *Vibrio ordalii*

*Vibrio ordalii* ble tidligere referert til som *Vibrio anguillarum* biotype II (Schiewe and Ordal, 1977), og er genetisk svært nært beslektet *Vibrio anguillarum*. Det er derfor ikke helt avklart hvor og når denne bakterien først ble registret. Bakterien ble først isolert som agenset som forårsaket *Vibriose* i oppdrett og vill Coho/sølv laks (*Oncorhynchus kisutch*) fra den Amerikanske nord-vest kysten i 1976, men hadde da navnet *Vibrio sp.* 1667 (Harrell et al. 1976). Senere er *Vibrio ordalii* rapportert fra Australia, New Zealand og Japan hovedsakelig fra ulike salmonide-arter i oppdrett (Ransom et al. 1984, Toranzo et al. 2017). I 2004 ble bakterien beskrevet fra Chile hvor det var registrert dødelighet på Stillehavslaks, Atlantisk laks og regnbueørret (Colquhoun et al. 2004, Silva-rubio et al. 2008). *Vibrio ordalii* er også rapportert fra andre fiskearter som ayu og uer (*Sebastes schlegelik*) fra Japan og sjøbrasme fra Tyrkia (Akayli et al., 2010). *Vibrio ordalii* fikk navnet sitt i 1981 av Schiewe med flere (Schiewe et al., 1981). Dette var etter omfattende undersøkelser, basert på biokjemiske egenskaper, DNA homologi med biotype 1 som viste at *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum* er 58-69% relatert basert på DNA-DNA hybridisering (DDH). DDH likhet under 70% indikerer separate arter (Naka et al., 2011, Meier-Kolthoff et al., 2013). I senere tid har det likevel vært debatter om *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* representerer ulike arter. Steinum et al., (2016) gjorde omfattende studier som viste relativt stor genetisk variasjon mellom artene. En *Vibrio ordalii*-lignende bakterie er også isolert fra nyere marine oppdrettsarter, som torsk og rognkjeks, i Nord-Atlantehavsområdet (Steinum et al., 2016). Grunnen til at denne kalles *Vibrio ordalii*-lignende er på bakgrunn av 16S rRNA likhet med andre *Vibrio ordalii* isolater fra Stillehavsområdet, i tillegg til forenlige fenotypiske trekk (pers. kom. Duncan Colquhoun). Syk fisk er ofte assosiert med nekrotiske og hemoragiske lesjoner i hud rundt infeksjonsstedet,

ofte rundt gattet og ved ventral finner. Utstående øyner og væskefylt tarm kan også forekomme (Fig.1.5). Blodfylte byller er observert i huden hos Atlantisk laks. Bakterien finnes hovedsakelig i muskulatur og hud, med bakterielle kolonier eller aggregater av celler som kan erstatte store deler av vertens vev (Ransom et al., 1984). Kolonier av *Vibrio ordalii* er også vanligvis funnet i løst bindevev i gjeller, hjertemuskulatur, hele tarmkanalen og pylorussekker. Mikrokolonier kan observeres i nyre og lever, med små mengder bakterieceller i blodet (Woo and Bruno, 1999).



Figur 1.5 – Rognkjeks infisert med *Vibrio ordalii*. Fisken har utstående øyne (eksoftalmi) og væskefylt tarm.  
Foto: Jan Arne Holm, Fishguard AS

*Vibrio ordalii* har under laboratorieforhold en optimal vekst ved 15-37 °C og krever salt i mediet for å vokse (Woo and Bruno 1999, Toranzo et al., 2017). Bakterien vokser med små hvite eller gjennomsiktige kolonier (Fig.1.6), negativ for agrinine, orthinine og lysin-reaksjon, vibriostat-sensitiv og oksidase positiv (Colquhoun et al., 2004). Genomet til bakterien består av to sirkulære kromosomer, i tillegg finnes det et kryptisk plasmid (pMJ101) hos noen stammer, men dette er ikke kartlagt hos alle. Plasmidet er ikke relatert til pJM1 virulens plasmidet som er representert i *Vibrio anguillarum* O1 (Schiewe et al., 1981, Toranzo et al., 2017). Genomet er mye mindre enn genomet for *Vibrio anguillarum*, og er til sammen ca. 3.4 Mbp, med et GC-forhold på 43-44 %. Det finnes lite informasjon om tilstedeværelsen av *Vibrio ordalii* i det akvatiske miljøet, derfor er det noe uklart om vann er et naturlig reservoar (Ruiz et al., 2016).

For *Vibrio ordalii* infeksjon utvikles bakterieanemi sent i sykdomsforløpet, og konsentrasjon av bakterier i blodet er relativt lav. Bakteriene samler seg som kolonier eller aggregater av celler i det infiserte vevet. For *Vibrio anguillarum* oppstår histopatologiske endringer i mye tidligere stadier av infeksjonen, hvor store mengder bakterier er til stede i blodet. I tillegg er bakteriene jevnt fordelt i det infiserte vevet sammenlignet med *Vibrio ordalii* (Naka et al., 2011).



Figur 1.6 - Vekst av *Vibrio ordalii* på blod-agar m/2% NaCl etter 4 dager ved 22°C. Foto: Lisa Øvredal

## 1.8 Epidemiologi - bakterier

Mikroorganismer eller mikrober er organismer som finnes over alt og består av en eller veldig få celler. Virus, sopp og bakterier er eksempler på dette. Mikroorganismene har hatt stor betydning for utviklingen av jorden, og var lenge de eneste som fantes, før annet liv ble til. Bakteriene har vært en av de viktigste årsakene til at jorden kunne være levelig for blant annet mennesker og dyr (Murray, 1990, Campbell et al., 2015). Dette er små encellede organismer som kun kan sees gjennom mikroskop. Bakteriene hører til i riket Bacteria og kalles prokaryote organismer fordi de mangler cellekjerne (Campbell et al., 2015). Mangfoldet av bakteriearter er enormt, og de fleste er ufarlige. Noen er patogene og forårsaker sykdom hos det infiserte individet. Både mennesker og dyr har bakterier både rundt og i seg hele livet, og dette er helt nødvendig for overlevelse. Når det gjelder de patogene bakteriene er det viktig å tilegne seg kunnskap for å forebygge, forhindre eller kurere store epidemier hos infiserte individer (Murray, 1990). Epidemiologiske studier dreier seg om spørsmål som gjelder smittekilde, sykdomsutbredelse i populasjoner, smittespredning, helsetilstand, årsak til sykdom og død. Data fra gode epidemiologiske studier kan settes sammen og gi en enkel oversikt som generer ny kunnskap. Bakterietyping er en viktig del av epidemiologiske studier for infeksjonsforebygging og kontroll (Tenover et al., 1997).

## 1.9 Bakteriell-typing; ulike metoder

En typingsmetode i bakteriologisk sammenheng er definert som en metode som kan brukes til å skille bakterier lavere enn arts-nivå (Olsen et al., 1993). Typing innebærer å identifisere genetisk variasjon innen en art, som videre kan relateres til annen epidemiologisk informasjon (Van Belkum et al., 2007). Før en typingsmetode kan tas i bruk må den evalueres og valideres med hensyn til en rekke kriterier. Det er ingen ideell, universell anvendelig bakteriell typingsmetode, men metoden bør velges ut fra hvilket formål undersøkelsen er til. Det er dermed viktig med standardisering og enighet mellom laboratorier rundt de mest vanlige metodene (Marples and Rosdahl 1997, Bean, 1999). Metoden må være i stand til å typebestemme og skille nært beslektede isolater. Den må enkelt kunne reproduseres, med standardiserte protokoller og personellopplæring. Det er også en fordel at metoden er rask, enkel og lav i kostnad. Ideelt sett må dataene som registreres være lett tilgjengelig i en database og enkelt kunne overføres mellom forskjellige systemer (Sabat et al., 2013, Van Belkum et al., 2007).

## 1.10 Fenotypisk karakterisering

Identifikasjon og typing av bakterier har i mange år kun vært basert på fenotypisk karakterisering, hvor metoder der fysiske og metabolske egenskaper hos bakterien studeres. Dette innebærer organismens observerte karakteristikk eller trekk som inkluderer farge, lukt, kolonimorfologi, struktur, utviklingsprosess, biokjemiske og fysiologiske egenskaper som temperatur for optimal vekst, behov for salt og foretrukket pH for å nevne noe (Donelli et al., 2013). For observasjon av noen av karakteristikkene kreves spesialisert teknologi for dokumentasjon. Når fenotypiske metoder utføres er standardisering av testene veldig viktig, fordi bakterier har en «plastisk» fenotype som betyr at de kan endres som følge av omgivelsene (Van Belkum et al., 2007). Fenotypisk karakterisering av bakterier kan utføres gjennom ulike tester som elektron-mikroskopi, gram farging, observasjon av syre produksjon fra diverse sukkerarter (karbohydrat kilder) under aerobt/anaerobt forhold (OF-test), oksydase produksjon, vibriostat sensitivitet, anaerobvekst, arginin, lysin, ornithine tester (ALO-test) (Donelli et al., 2013, Olsen et al., 1993). Dette er klassiske fenotypiske-metoder som fortsatt tas i bruk, og er en viktig kilde til informasjon for foreløpig beskrivelse av taxa (grupper), fra artsnivå til slekt og familie. Det er viktig å vite at fenotyping kun gir indikasjoner på genotypen, og kan dermed gi misledende resultater. Metodene er imidlertid fin for å bekrefte at det faktisk er den bakterien



en ser etter, med forutsetning at man har kunnskap om fenotypiske trekk for bakterien fra før. Eksempler på fenotypings metoder;

Biotyping, hvor det blir utført ulike tester for å vurdere biokjemiske prosesser som skiller ulike bakteriearter (Olsen et al., 1993).

Serotyping, som innebærer identifisering av O-antigener hos bakterien ved hjelp av spesifikke antistoffer. O-antigener er repeterende enheter i lipopolysakkaridene, og er en del av yttermembranen hos gram-negative bakterier (Sørensen and Larsen, 1986). Videre kan bakterier innen samme art kategoriseres med ulike serotyper ut fra hvilken antigen de har på overflaten. Eks. *V. anguillarum* O1 og *V. anguillarum* O2.

Fagtyping, innebærer karakterisering av bakterier basert på følsomhet for infeksjon av et bestemt utvalg bakteriofager. Bakteriofager er virus som angriper bakterier. De er svært vertsspesifikke og angriper kun en bestemt bakterieart eller bestemte stammer innen samme art (Olsen et al., 1993).

Disse typingsmetodene er generelt ikke tilstrekkelig for å få oversikt over bakterienes evolusjonære relasjoner og klarer ofte ikke skille bakteriearter innen samme familie eller isolater innen samme art (Zaidi et al., 2003). For å være sikrere på taksonomisk plassering av bakterien, og kunne komplett beskrive og skille ulike taxa, må fenotyping følges opp av genotypiske analyser. Den genetiske koden hos bakteriene må studeres og videre kartlegges. Til dette benyttes molekylærbiologiske typingsmetoder.

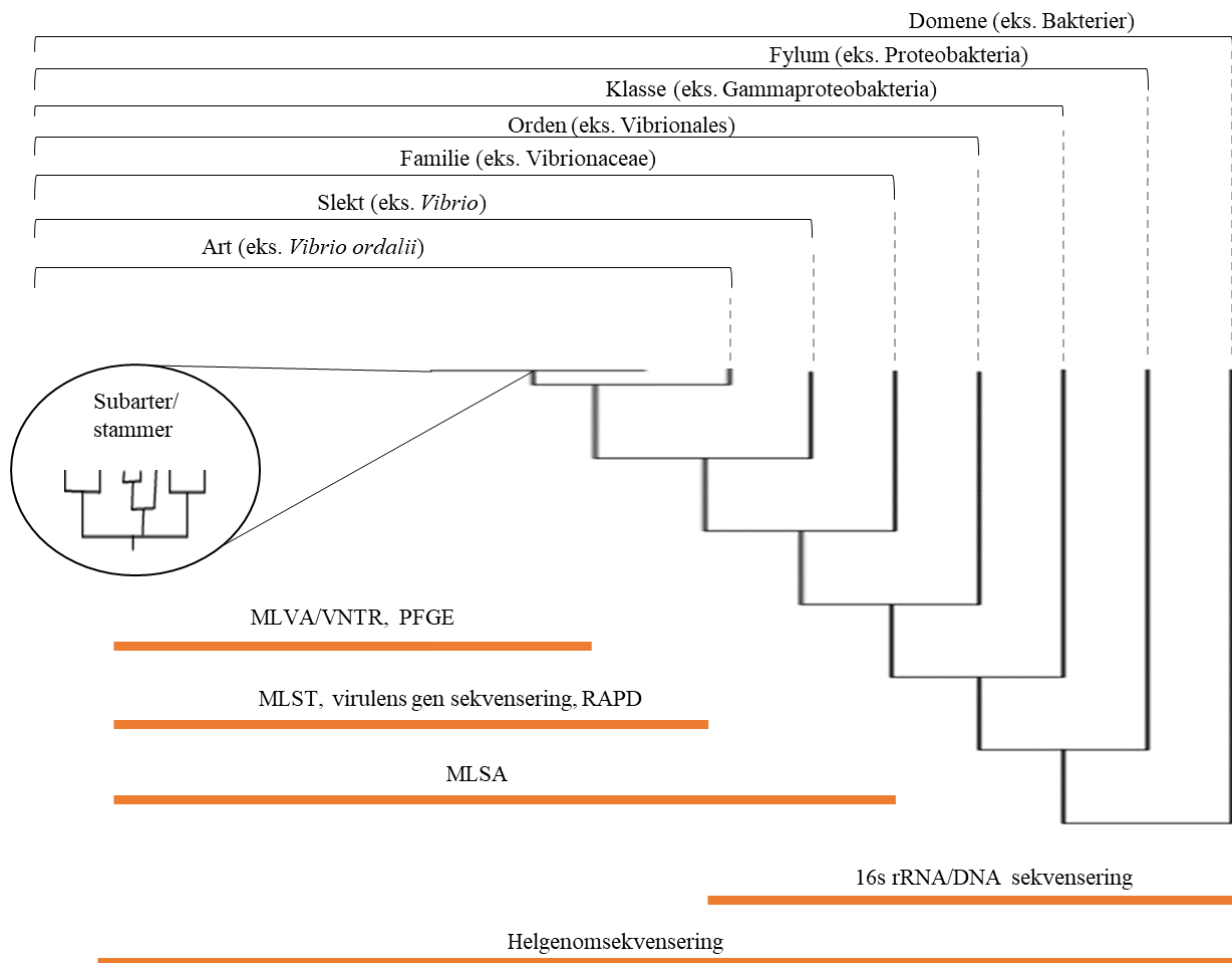
## 1.11 Den genetiske koden

Alle levende organismer bærer en genetisk kode som finnes i DNA-molekylene, eller arvestoffet. Den genetiske koden gir informasjon om egenskaper, oppbygging og utseende til organismen. DNA (deoksyribonukleinsyre) er bygget opp av to tråder som en dobbel heliks som roterer mot klokken (Sinden and Alkek, 1994). Dette er to enkle DNA tråder som holdes sammen ved hjelp av hydrogenbindinger i en antiparallell retning. Det vil si at ene tråden er orientert  $5' \rightarrow 3'$ , og andre tråden er orientert  $3' \rightarrow 5'$ . Dobbelt heliksens «ryggrad» består av fosfatgrupper og suktermolekyler. Inni heliksen er det noe som kan ligne på trappetrinn. Disse trinnene består av nitrogenholdige baser og er festet til suktermolekylene. Fire ulike baser finnes i DNAet, to puriner; cytosin (C) og guanin (G) og to pyrimidiner; tymin (T) og adenin (A). Basene i dobbelt heliksen er satt sammen i basepar, to og to baser. C vil alltid danne basepar med G, og T vil alltid danne basepar med A. Tre baser ved siden av hverandre, kalt kodon, på

det enkelttrådede DNAet kan til sammen kode for en aminosyre. Det er i teorien 64 mulige kodon, og 20 ulike aminosyrer. Derfor kan flere kodon kode for samme aminosyre, kalt degenerert koding (Sinden and Alkek, 1994). Hele sekvensen av baser koder for en kjede med aminosyrer som igjen blir satt sammen til proteiner. En organismes genom dreier seg om alt arvematerialet og inkluderer både gener og ikke kodende sekvenser. Et spesifikt område i genomet, for eksempel et område som koder for et spesielt gen, kalles et lokus. Disse lokiene kan ha ulik rekkefølge i basene og genetisk diversitet skapes på bakgrunn av variasjoner i disse (Ohno 1970, Sinden et al. 1994).

## 1.12 Molekylærbiologiske typingsmetoder

Molekylærbiologiske metoder for typing av bakterier baseres på DNA sekvenser. Samme metode kan til tider brukes både til diagnostisk deteksjon og til epidemiologisk typing av bakteriestammer (Zaidi et al., 2003, Naber, 1994). Utvikling og kunnskap innen molekylær bioteknologi har sørget for at det i dag er en rekke metoder tilgjengelig og gjort det mulig å kartlegge baserekkefølgen i DNAet og sekvensere hele arvestoffet. Genotypiske analyser rettet mot DNA og RNA molekyler har ført til en enorm forbedring i evnen vår til å identifisere og klassifisere bakterier, og videre skille stammer innen samme art. Molekylære typingsmetoder tilgjengelig i dag er hovedsakelig basert på restriksjonsanalyser av bakterielt DNA, PCR-amplifisering av spesifikke genetiske mål og identifikasjon av DNA-sekvensvariasjoner (Donelli et al., 2013). Molekylær typing er svært sensitiv og effektiv, og gir mer detaljert informasjon rundt evolusjonære forhold enn de fenotypiske metodene (Zaidi et al., 2003). Valg av molekylær typingsmetode avhenger av problemet som skal løses og den epidemiologiske konteksten metoden skal benyttes i. Kriteriene nevnt tidligere er dermed viktig å følge ved utvelgelse av metode (Sabat et al., 2013). Metoder som helgenomsekvensering (WGS/HGS) (Parkhill and Wren, 2011), MultiLokus Sekvens Typing (MLST) (Maiden et al., 1998), MultiLokus Sekvens Analyse (MLSA) (Thompson et al., 2007), MultiLokus Variable Nummer Tandem Repeterende Analyse (ML(VNTR)VA) (Thompson et al., 2007), Puls-felt Gel Elektroforese (PFGE) (Schwartz and Cantor, 1984), Randomisert Amplifikasjon av Polymorfisk DNA (RAPD) (Williams et al., 1990), DNA-DNA hybridisering (Martens et al., 2008) og 16S rRNA/rDNA (Weisburg et al., 1991) er i dag noen av dem som brukes for identifikasjon og kartlegging av bakteriearter. I tillegg suppleres det med fenotypisk karakterisering. Oversikt over et utvalg molekylærbiologiske typingsmetoder, med oppløselighet i forhold til taksonomisk nivå er vist i figur 1.7.



Figur 1.7 - Oversikt over noen molekylærbiologiske typingsmetoder for bakterier. Figuren viser oppløsningsevnen for ulike metoder (oransje linje) mot ulike taksonomiske nivåer. Illustrasjon: Lisa Øvredal. Inspirasjon fra Gulla, 2015

Molekylærbiologisk typing kan deles inn i genetisk «fingerprint» og sekvensbasert typing. «Fingerprinting» baseres på PCR-amplifikasjon og bedømmelse av størrelse på DNA-fragmentene i agarose gelelektroforese eller kapillærelektroforese (Lindstedt 2005, Van Belkum et al., 2007), og baseres ikke på sekvensanalyser. Metoden er noe informativ, men lite transportabel mellom systemer. «Fingerprinting» kan benytte spesifikke repeterende lokus med spesifikke primere, uspesifikke lokus med randomiserte primere eller svært variable individuelle loki/regioner som ikke er karakterisert i genomet (Lindstedt, 2005). Dette brukes videre til å skille mellom organismer innen samme art. Eksempler på genetisk «fingerprint» metoder er MLVA/VNTR, PFGE og RAPD (Lindstedt, 2005).

Ved sekvensbasert typing blir baserekkefølgen i et gen eller hele genomet kartlagt. Dette er en svært informativ og transportabel metode. På 1970-tallet ble Sanger-sekvensering introdusert av Frederick Sanger som den første sekvenseringsmetoden også kjent som «første generasjons

sekvensering» (Sanger and Nicklen 1977, Metzker 2010). Metoden bruker terminerende nukleotider for å lage DNA-tråder av forskjellig lengde. Videre blir DNA analysert for å få fram baserekkefølgen i sekvensen ved hjelp av gel-elektroforese. På den måten oppnås tilgang til organismens genetiske kode (Sanger and Nicklen, 1977). Det har vært en stor utvikling innen sekvensering de siste årene, hvor effektivitet og kostnader er forbedret. Nye sekvenseringsmetoder kalles «neste generasjons sekvensering» (NGS) og kan sekvensere større mengder DNA på kortere tid enn tidligere. Dette har ført til tilgang på store mengder genetisk informasjon som må behandles. Gode plattformer for rask og effektiv analyse av dataen er svært viktig. Derfor er det innvilget store pengesummer de siste årene til utvikling av NGS-plattformer (Metzker, 2010).

### 1.12.1 Helgenomsekvensering

Helgenomsekvensering (HGS) er en metode hvor hele DNA-sekvensen til en organismes genom bestemmes. Metoden har vist svært lovende resultater for epidemiologiske undersøkelser og kan gi maksimal oppløsning for å skille nært beslektede arter (Popovich and Snitkin, 2017). HGS er nå en relativt rask metode som sekvenserer hele genomet på en gang, noe som er en stor fordel. Metoden gjør det mulig å identifisere enkle basemutasjoner i hele genomet (Didelot et al., 2012). En viktig forutsetning for effektiv bruk av HGS er tilgjengelighet av plattformer for bioinformatikk som er enkel å ta i bruk for analyse og databehandling (Sabat et al., 2013). Det finnes flere forskjellige slike plattformer, og eksempler på dette er Illumina, Complete Genomics (CG), Ion Torrent og Pacific Biosciences (Quail et al. 2012, Lam et al. 2012). Av disse teknologiene er det Illumina og CG som benyttes mest. Lam et al. 2012 gjorde en sammenligning av de to, hvor CG ser ut til å være mer nøyaktig enn Illumina. Illumina gir lengre «reads» og har mulighet til å sekvensere lengre fragmenter, og egner seg til sekvenser i vanskelige repeterte regioner. Begge teknologiene har sine fordeler, men begge har også sine mangler. Derfor anbefales det å sekvensere genomet med flere plattformer, for sikrest mulig resultat (Lam et al., 2012). I dag er flere og flere HGS sekvenser tilgjengelig og kostnadene har gått ned de siste årene. Men det er likevel en relativt dyr prosess i form av tid og personell. Lagring av store data er også en utfordring samt mangel på kompetanse innen bioinformatikk til analyse av dataen (Popovich et al., 2017, Ellington et al., 2017). Det er også begrensninger på tilgjengeligheten av HGS sekvenser til relaterte arter. Det er blitt utviklet andre alternative analyser, som ikke krever fulle genom-sekvenser for å identifisere slektskap mellom bakterier (Martens et al., 2008). Eksempler på slike analyser er

MLST og MLSA. Disse analysene er dyrere, men tar kortere tid å utføre og krever mindre bioinformatikk-kompetanse.

### 1.12.2 16S rRNA restriksjonsanalyser

16 Sveberg ribosomal RNA (16S rRNA) er en komponent i den lille subenheten 30S i prokaryoters ribosom. 16S rRNA er RNA produktet fra 16S rRNA genet. Sekvensanalyse av dette genet har vært «gullstandard» ved identifisering og klassifisering av bakterier sammen med DNA-DNA hybridisering (DDH). Ved DDH blir to fullstendige genom sammenlignet, og sekvenslikhet vurderes (Stackebrandt and Goebel, 1994, Martens et al., 2008). Grunnen til at 16S rRNA genet brukes er fordi alle kjente bakterier har dette genet, i tillegg til at det er svært konserverert. 16S rRNA sekvensanalyse har vist høy oppløsning for å bestemme grad av slektskap mellom organismer høyere enn artsnivå, det vil si ned til genusnivå (Stackebrandt and Goebel, 1994). Observasjoner viser at organismer med en total genomisk likhet over 70% utført ved DDH, har mer enn 97% 16S rRNA gensekvens likhet (Stackebrandt and Goebel 1994, Martens et al., 2008). Dette viser at genet mangler oppløsningsevne når bakterier skal skilles på artsnivå eller lavere. Studier utført på bakterier tilhørende ulike arter, har vist tilnærmet identisk 16S rRNA gensekvenser (Amann et al., 1992, Martens et al., 2008). Dette har lagt grunnlag for nyere metoder som tar i bruk flere molekylære markører i genomet når nært beslektede arters fylogeni skal studeres.

### 1.12.3 Puls-Felt Gel Elektroforese

Puls-Felt Gel Elektroforese (PFGE) er en typingsmetode for separasjon av store DNA-molekyler (helt genomisk DNA) (Schwartz and Cantor, 1984). Molekylene brytes ned ved hjelp av spesielle restriksjonsenzymmer og overføres til en gel-matrix i buffer. Flere par elektroder med elektrisk spenning er koblet til, som periodevis endrer retning mellom parene for å separere DNA-fragmentene basert på størrelse. I tradisjonell agarose gel elektroforese, går den elektriske spenningen kun en retning. Elektrisk spenning fra flere kanter gjør det derfor mulig å separere store DNA-molekyler. Videre gir dette en god representasjon av hele bakterie-kromosomet i en enkel gel, med en reproducerbar restriksjons-profil, som gir tydelige og veloppløste DNA-fragmenter (Sharma-Kuinkel et al., 2016). En forgjenger for PFGE er MLEE (MultiLokus enzym elektroforese) en metode hvor variasjon i metabolske enzymer skilles på grunnlag av elektroforetiske mobiliteter (Tang et al., 2002, Maiden et al., 1998). MLEE brukes ikke i dag, men konseptet er videreutviklet i MultiLokus Sekvens Typing (MLST). Både MLST og MLSA tar for seg husholdningsgener for analyse.

#### 1.12.4 Husholdningsgen-analyser

På ulike loki i genomet er det gener som kalles «husholdningsgener». Genene er helt nødvendig for organismen og koder for essensielle produkter for opprettholdelse av normal cellefunksjon (Butte et al., 2001). Husholdningsgenene antas å være relativt stabile med en konstant, treg utvikling og er et godt utgangspunkt for fylogenetiske analyser (Urwin and Maiden, 2003). Det er flere kriterier som må oppfylles før et gen aksepteres som «husholdningsgen». Genet skal bare finnes som enkelt kopi i genomet, med dN/dS ratio  $< 1$ , som vil si «neutral» eller «purifying» seleksjon og bør optimalt ikke ligge i nærheten av andre gener som benyttes i samme analyse (Dasmeh et al., 2014). dN står for ikke synonym substitusjon, en mutasjon som endrer aminosyresekvensen til genet. dS står for synonym substitusjon eller «stille» mutasjon som ikke endrer aminosyresekvensen. dN/dS ratio tilnærmet 1 vil si ingen seleksjon for genet. Er dN/dS ratio  $> 1$  vil si en positiv seleksjon for genet. For husholdningsgener bør dN/dS derfor ligge signifikant  $< 1$ , da er genet relativt konservert men under sakte endring, «neutral» seleksjon (Dasmeh et al., 2014, Wei et al., 2018). I robuste fylogenetiske analyser blir flere husholdningsgener brukt i en kombinasjon. Utvalg av gener vil avhenge av hvilke taxon som skal undersøkes. Det stilles visse krav til utvalg av slike gener. Genene bør ha 100% utbredelse blant alle taxon i undersøkelsen, de kan være store, men området som skal sammenlignes i analysen bør ligge rundt 400-500 bp. Ved denne lengden siktens begge DNA-tråder å bli nøyaktig sekvensert i en sekvenseringsreaksjon. Genene bør også velges fra ulike områder i hele genomet slik at rekombinasjon unngås og bør heller ikke være flankert av gener med stort seleksjonspress. Tilgjengeligheten av helgenomsekvenser har i stor grad tilrettelagt for identifikasjon av egnede loki (Stackebrandt et al., 2002, Urwin and Maiden, 2003).

#### 1.12.5 MultiLokus Sekvens Typing (MLST)

MLST ble første gang lagt frem i 1998 av Maiden et al., og er en nukleotidsekvens-basert karakterisering av bakterier eller andre organismer. Alleler identifiseres ved å kartlegge variasjoner i sekvensene hos organismen istedenfor å se på variasjoner i elektroforetisk mobilitet i enzymerne til isolatene, som ved MLEE. Denne modifikasjonen har hatt store fordeler ved at mange flere variasjonen har kunnet oppdages, som resulterer i langt flere alleler per lokus (Maiden et al., 1998). Alleler er variasjoner på et bestemt gen på kromosomet og kan endre funksjonen til det kodete proteinet og videre fenotypen til organismen (Campbell et al., 2015). MLST bruker flere husholdningsgener som er et godt utgangspunkt for karakterisering av isolater og sekvensdata som registrerer endringer i disse. Hver unik sekvens for et gitt lokus får et eget allel (AT) nummer (allel 1, allel 2 etc.). På den måten kan allelene for hvert MLST

loki for et gitt isolat grupperes i en allel-profil, og videre få tildelt en sekvenstype (ST), vist i tabell 1.2. Dette er en klyngeanalyse som baserer slektskap på forskjeller mellom allelene i husholdningsgenene og kan noen ganger gi ufullstendig fylogeni. (Maiden et al., 1998, Urwin and Maiden, 2003). Når et MLST system skal designes må noen elementer bestemmes; isolater for evaluering, valg av gen-lokus og valg/design av primere for sekvensamplifikasjon (Urwin and Maiden, 2003). MLST er enkelt reproduserbart når det gjelder utstyr og reagenser som er lett å få tak i. Metoden krever heller ikke tilgang på levende bakterieisolater eller høy-kvalitets genomisk-DNA (Bykadorov, 2017). I tillegg kan sekvensdata sammenlignes raskt og enkelt mellom laboratorier, og dermed brukes som et globalt epidemiologisk verktøy for overvåkning (Maiden et al., 1998).

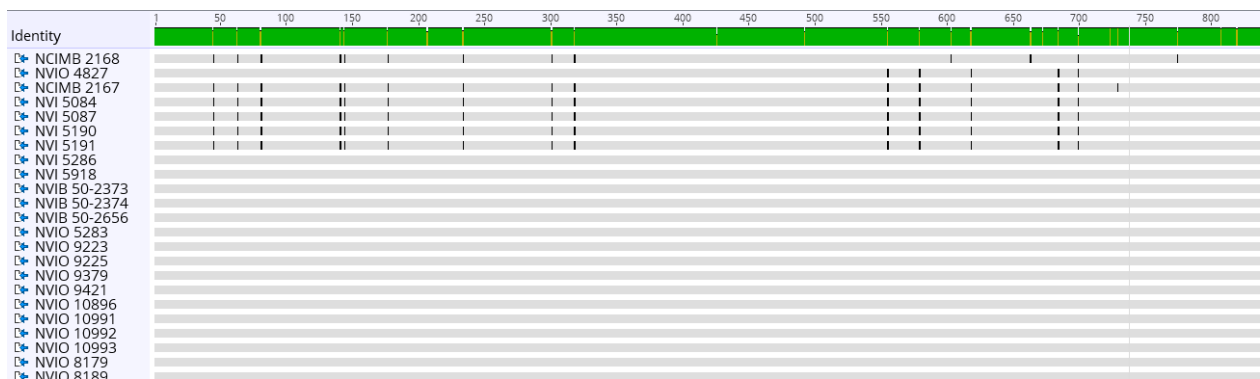
Tabell 1.2 - Oversikt over isolater og gener med i MLST analysen. Røde markører viser allelvarianter i et lokus, hvor isolatene skilles av fem baser. Hver unik variasjon i alleltyper (AT) har fått et eget nummer, merket med grønn. De to isolatene har fått tildelt sekvenstype (ST) 1 og 2, merket med blå. Resultatene kan legges inn i en software og videre danne en fylogenetisk oversikt

stamme	AT	mreB	AT	atpA	AT_a	sum AT	ST	automatisk annotasjon (til eBURST)					
								ropA	gyrB	topA	pyrH	gapA	mreB
NVIB 50-2373	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	111111111	1	1	1	1	1	1	
NVIB 50-2374	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	111111111	1	1	1	1	1	1	
NVIB 50-2656	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	111111111	1	1	1	1	1	1	
NVIO 4827	2	TCGCCCCGG	2	ATAACAAT	1	22222212	2	2	2	2	2	2	
NVIO 5283	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	111111111	1	1	1	1	1	1	
NVIO 8171	3	CAGTCTGGG	3	ATAACAAT	1	33333313	3	3	3	3	3	3	
NVIO 8179	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	114111111	4	1	1	4	1	1	
NVIO 8189	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	114111111	4	1	1	4	1	1	
NVIO 8458	3	CAGTCTGGG	3	ATAACAAT	1	33333313	3	3	3	3	3	3	
NVIO 8656	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	114111111	4	1	1	4	1	1	
NVIO 8713	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	114111111	4	1	1	4	1	1	
NVIO 8730	1	CAGTCCGAG	1	ATAACAAT	1	114111111	4	1	1	4	1	1	

### 1.12.6 MultiLokus Sekvens Analyse (MLSA)

MLSA benytter samme analyseprinsippet som MLST, og er en alternativ tilnærming til genotyping av bakterier. Analysen er også nukleotidsekvens-basert, og bruker ofte de samme husholdningsgenene som MLST. I motsetning til MLST som benytter klyngeanalyse for slektskapsrelasjon, bruker MLSA en avstandsmetode og ser på parvise genetiske forskjeller og likheter for å bestemme slektskap (Richter et al., 2006). Her skilles isolater på bakgrunn av enkeltvise basemutasjoner, vist i figur 1.8. Samme kriterier gjelder for MLSA som for MLST, isolater, primere og gen-lokus må bestemmes. MLSA er i stand til å gi fra seg analyser til et stort taksonomisk spekter som inkluderer analyser på artsnivå til sub-artsnivå og analyser på høyere taksonomiske nivå (Martens et al., 2008). MLSA har vist veldig gode resultater, og er et godt alternativ til DDH når genetisk slektskap mellom bakterier fra en spesiell gruppe skal

studies. MLSA sammenligner likheter mellom delte gener innen en art, også kalt ANI (average nucleotide identity). Konstantinidis og Tiedje viste at ANI verdier  $\approx 94\%$  korresponderte med den tradisjonelle 70 % DNA-DNA-standard for arts-definisjon (Konstantinidis and Tiedje, 2005). MLSA gir nøyaktige data som kan sammenlignes med sekvensanalyser fra ukjente organismer gjennom datasystemer, og kartlegge sammenhenger mellom nært beslektede organismer (Gevers et al., 2005). Ved identifikasjon av en bakterie kan det være tilstrekkelig å undersøke to selvstendige husholdningsgener, for en fylogenetisk analyse er flere husholdningsgener nødt å inkluderes.



Figur 1.8 -Viser hvordan isolater i en MLSA skiller på bakgrunn av basemutasjoner. Hver svart strek i alignmentene viser en basemutasjon for hvert enkelt isolat, som er ulik fra konsensus (den sekvensen som går igjen mest). Denne informasjonen kan brukes for å konstruere fylogenetiske oversikter

### 1.12.7 MultiLokus Variable Nummer Tandem Repeterende Analyse (MLVA/VNTR)

MLVA er en metode som benytter naturlig forekommende variasjoner i tandem repeterende (TR) DNA-sekvenser for typing av bakterier. TR-sekvenser er funnet representert i DNAet til alle organismer hvor hele genomet er sekvensert (Bichara et al., 2006). Tandem repeterende sekvenser (TRS) er kopier av en DNA sekvens som ligger repeterende etter hverandre i samme retning, kalt direkte tandem repetisjoner, eller i motsatt retning av hverandre, invers tandem repetisjoner (Tandem Repeat Sequences, 1999). Sekvenser bestående av flere repeterende enheter slik som TRS, har vist seg å ha forholdsvis høy mutasjonsrate, både i prokaryote- og i eukaryote organismer (Bichara et al., 2006). “Variable Number of Tandem repeats” (VNTRs) er korte TRS som varierer i antall kopier mellom beslektede organismer og forårsakes av endring i antall kopier av den repeterende enheten. VNTRs har vist seg å være et godt utgangspunkt for undersøkelse av genetisk variasjon mellom bakteriearter, og selve analysen av flere VNTRs kalles «Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis» (MLVA)



(Van Belkum et al., 1998, Bichara et al., 2006, Van Belkum, 2007). MLVA er akseptert som referansetypings metode for flere bakterie-arter og representerer en høyt oppløselig typingsmetodikk. Den er også brukt for å analysere epidemiologi/epizootiologi hos flere ulike fiske-relaterte bakterier som *Yersinia ruckeri* og *Renibacterium salmoninarum* (Gulla et al., 2018, Matejusova et al., 2013). MLVA er en «fingerprint» metode som baserer seg hovedsakelig på PCR-amplifikasjon og bedømmelse av størrelse på DNA-fragmentene i agarose gel-elektroforese eller kapillærelektroforese, ikke på sekvensanalyser (Van Belkum 2007). Det er ikke en fylogenetisk analyse i seg selv, men heller en metode for å detektere genetiske forskjeller. MLVA skiller ikke mellom slekt/familie, men kan skille mellom nært beslektede arter/subarter på grunn av den raske endringen hos VNTR-lokiene som undersøkes. Analysen gir dermed ikke en langsiktig epidemiologisk overvåking, men fungerer godt ved smittesporing (Lindstedt, 2005, Li et al., 2009). Data er enkelt overførbart mellom systemer og kan i noen tilfeller gi en oppløsning tilsvarende helgenomsekvensering. Metoden er hurtig, relativt billig og lite tidskrevende (Eyre et al., 2013).

### **1.12.8 Virulensgen-analyse**

Virulensgen-analyse er en metode som kan gi høy resolusjon ved å skille svært nært beslektede arter eller sub-arter. Dette er på grunnlag av den raske evolusjonære utviklingen, på grunn av positiv seleksjon som ofte sees hos denne typen gener (Li et al., 2009, Sabat et al., 2013). Virulens- eller virulens assosierte gener spiller ofte en viktig rolle når det gjelder overlevelse og celle til celle spredning hos bakteriene. På grunn av eksponering for hyppig miljøendringer, som for eksempel respons fra immunsystemet, endres disse virulensgenene relativt raskt i forhold til husholdningener. Som følge av dette kan virulensgenene ha en høyere grad av nukleotidsekvens polymorfisme og høyere oppløsningsevne for svært nært beslektede arter enn lokale epidemiologiske studier (Zhang et al., 2004). Analyse av denne typen gener kan gi feilaktige fylogenetiske relasjoner nettopp på grunn av genenes raske evolusjonsrate. Ideelt sett bør en virulensgen-analyse gjøres på et større antall isolater, i tillegg sammen med andre metoder som MLSA eller MLST, hvor husholdningsgener inkluderes (Sabat et al., 2013).

## 1.13 Mål med studiet

- Hovedmålet med studien var å kartlegge populasjonsgenetikken hos en rekke isolater av *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra hovedsakelig syk rognkjeks, men også isolater fra torsk, laks og hyse. Med spesielt fokus på hvordan *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet plasseres i forhold til *Vibrio ordalii* fra Stillehavet og *Vibrio anguillarum*.
- Det ble utført en MultiLokus Sekvens Analyse (MLSA) og en MultiLokus Sekvens Typing (MLST) på samlingen av *Vibrio ordalii*, *Vibrio ordalii*-lignende og *Vibrio anguillarum* isolater. Åtte husholdningsgener; *atpA*, *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *rpoA*, *topA* og *pyrH* ble sekvensert og analysert.
- Det ble utviklet og utført en MultiLokus Variable Nummer Tandem Repeterende Analyse (MLVA) av seks VNTR-loki for å få bedre oppløsning på slektskap mellom bakterieisolatene av *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet.

### **Del mål:**

- Identifisere isolater gjennom fenotyping, MALDI-TOF og 16S rRNA sekvensering
- Finne passende husholdningsgener og tilhørende primere for analyse
- Designe primerpar for husholdningsgeneanalyse
- Prosessering av sekvensdata
- Designe VNTR-primere for utvikling av MLVA
- Konstruksjon av fylogenetiske trær

## 2 Materielt og metode

### 2.1 Bakteriestammer

En oversikt over stammer, med lokalt frysernummer (stammenummer), geografisk opprinnelse, årstall og fiskeart bakteriene er isolert fra, samt bakterienavn er lagt inn i tabell 2.1. Alle isolater i tabellen er tidligere karakterisert og artsbestemt av Veterinærinstituttet. I denne studien inngår totalt 56 ulike stammer av *Vibrio ordalii*, *Vibrio ordalii*-lignende og *Vibrio anguillarum* fra ulike geografiske områder og år (2003-2018). Ulike fiskearter inngår, men isolatene er i hovedsak isolert fra syk rognkjeks i Norge, både fra settefiskfase og etter utsett i sjø. 27 stammer av *Vibrio ordalii* og 8 stammer av *Vibrio anguillarum* ble tilsendt på blodagar (BA) fra Veterinærinstituttet i Oslo (NVIO) til Veterinærinstituttet i Bergen (NVIB). Tre *Vibrio ordalii*-lignende isolater ble hentet fra biobanken til VI Bergen. Alle stammer ble sådd om og inkubert ved 22°C. Deretter fryst ned ved hjelp av Mikrobank™ på – 80 °C. Det er også hentet inn 10 sekvenser av *Vibrio anguillarum* og 8 sekvenser av *Vibrio ordalii* fra Steinum et al 2016, vist i tabell 2.2 som er inkludert i analysene.

### 2.2 Mikrobank™

Et system designet for langtidslagring av bakteriestammer på frys. Ved hjelp av beholdere med små gule perler og cryopreserveringsmiddel kan isolatene lagres på svært lav temperatur i lang tid. Ved inokulering av Mikrobank™ ble prosedyren beskrevet i Pro-Lab Diagnostics Inc © 2015 fulgt. Ved behov for fersk kultur blir en perle fra beholderen strøket ut på vekstmediet og videre satt til inkubasjon.

Tabell 2.1 - Oversikt over isolater inkludert i denne studien, med stammenummer, årstall, vertsfisk, geografisk opprinnelse og bakterienavn

Stammenummer (NVIB/NVIO)	År	Vertsfisk	Geografisk opprinnelse	Bakterienavn
NVIB 50-2373	2018	Rognkjeks	Møre og Romsdal	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIB 50-2374	2018	Rognkjeks	Møre og Romsdal	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIB 50-2656	2018	Rognkjeks	Møre og Romsdal	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 4827	2003	Laks	Chile	<i>Vibrio ordalii</i>
NVIO 5283	2005	Torsk	Rogaland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8179	2011	Rognkjeks	Trøndelag	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8189	2011	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8656	2012	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8713	2012	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8730	2012	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8732	2012	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9109	2013	Rognkjeks	Trøndelag	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9223	2013	Hyse	Midthordland/Hordaland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9225	2013	Rognkjeks	Midthordland/Hordaland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9361	2013	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9379	2013	Rognkjeks	Midthordland/Hordaland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9421	2014	Rognkjeks	Midthordland/Hordaland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9821	2014	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 9972	2015	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10017	2015	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10019	2015	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10029	2015	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10087	2015	Rognkjeks	Troms	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10164	2015	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10170	2015	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10593	2016	Rognkjeks	Nordland	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10991	2017	Rognkjeks	England	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10992	2017	Rognkjeks	England	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 10993	2017	Rognkjeks	England	<i>Vibrio ordalii</i> -lignende
NVIO 8171	2011	Rognkjeks	Vest-Agder	<i>Vibrio anguillarum</i> O1
NVIO 8458	2012	Rognkjeks	Trøndelag	<i>Vibrio anguillarum</i> O1
NVIO 9260	2013	Rognkjeks	Trøndelag	<i>Vibrio anguillarum</i> O1
NVIO 9754	2014	Rognkjeks	Trøndelag	<i>Vibrio anguillarum</i> O2a
NVIO 10135	2015	Rognkjeks	Stjørdland	<i>Vibrio anguillarum</i> O2/O2aII
NVIO 10142	2015	Rognkjeks	Møre og Romsdal	<i>Vibrio anguillarum</i> O2/O2aII
NVIO 10243	2016	Rognkjeks	Rogaland	<i>Vibrio anguillarum</i> O2a
NVIO 10623	2016	Rognkjeks	Møre og Romsdal	<i>Vibrio anguillarum</i> O2a
NVIO 10896	2017	Rognkjeks	Vaxxinova	<i>Vibrio anguillarum</i>

Tabell 2.2 -Oversikt over sekvenser av *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum* hentet fra Steinum et al. 2016, inkludert i denne studien. Med stammenummer, vertsfisk, geografisk opprinnelse, bakterienavn og accession number

Stammenummer	Vertsfisk	Geografisk opprinnelse	Bakterienavn	Accession number fra GenBank
NVI 5191	Laks	Chile	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755418.1, KU755312.1, KU755206.1 KU755100.1, KU754888.1, KU754782.1 KU754676.1, KU754994.1
NVI 5190	Laks	Chile	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755417.1, KU755311.1, KU755205.1 KU755099.1, KU754993.1, KU754887.1 KU754781.1, KU754675.1
NVI 5087	Laks	Chile	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755413.1, KU755307.1, KU755201.1 KU755095.1, KU754989.1, KU754883.1 KU754777.1, KU754671.1
NVI 5286	Torsk	Norge	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755419.1, KU755313.1, KU755207.1 KU755101.1, KU754995.1, KU754889.1 KU754783.1, KU754677.1
NVI 5918	Torsk	Norge	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755424.1, KU755318.1, KU755212.1 KU755106.1, KU755000.1, KU754894.1 KU754788.1, KU754682.1
NVI 5084	Laks	Chile	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755412.1, KU755306.1, KU755200.1 KU755094.1, KU754988.1, KU754882.1 KU754776.1, KU754670.1
NCIMB 2167	Sølvlaks	USA	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755385.1, KU755279.1, KU755173.1 KU755067.1, KU754961.1, KU754855.1 KU754749.1, KU754643.1
NCIMB 2168	Sølvlaks	USA	<i>Vibrio ordalii</i>	KU755386.1, KU755280.1, KU755174.1 KU755068.1, KU754962.1, KU754856.1 KU754750.1, KU754644.1
NCIMB 2131	Regnbueørret	Norge	<i>Vibrio anguillarumO1</i>	KU755382.1, KU755276.1, KU755170.1 KU755064.1, KU754958.1, KU754852.1 KU754746.1, KU754640.1
NCIMB 6	Torsk	Norge	<i>Vibrio anguillarumO2a</i>	KU755387.1, KU755281.1, KU755175.1 KU755069.1, KU754963.1, KU754857.1 KU754751.1, KU754645.1
NCIMB 2133	Sei	Norge	<i>Vibrio anguillarumO2b</i>	KU755384.1, KU755278.1, KU755172.1 KU755066.1, KU754960.1, KU754854.1 KU754748.1, KU754642.1
NVI 4317	Regnbueørret	Norge	<i>Vibrio anguillarumO1</i>	KU755390.1, KU755284.1, KU755178.1 KU755072.1, KU754966.1, KU754860.1 KU754754.1, KU754648.1
NVI 5180	Regnbueørret	Norge	<i>Vibrio anguillarumO1</i>	KU755416.1, KU755310.1, KU755204.1 KU755098.1, KU754992.1, KU754886.1 KU754780.1, KU754674.1
NVI 6258	Regnbueørret	Norge	<i>Vibrio anguillarumO1</i>	KU755432.1, KU755326.1, KU755220.1 KU755114.1, KU755008.1, KU754902.1 KU754796.1, KU754690.1
NVI 5589	Laks	Norge	<i>Vibrio anguillarumO1</i>	KU755423.1, KU755317.1, KU755211.1 KU755105.1, KU754999.1, KU754893.1 KU754787.1, KU754681.1
NVI 4591	Laks	Norge	<i>Vibrio anguillarumO2a</i>	KU755394.1, KU755288.1, KU755182.1 KU755076.1, KU754970.1, KU754864.1 KU754758.1, KU754652.1
NVI 4631	Laks	Norge	<i>Vibrio anguillarumO2a</i>	KU755397.1, KU755291.1, KU755185.1 KU755079.1, KU754973.1, KU754867.1 KU754761.1, KU754655.1
NVI 4792	Torsk	Norge	<i>Vibrio anguillarumO2a</i>	KU755399.1, KU755293.1, KU755187.1 KU755081.1, KU754975.1, KU754869.1 KU754763.1, KU754657.1

## 2.3 Fenotypisk karakterisering

Fenotypisk karakterisering ble utført på seks av isolatene med mest varierende kolonimorfologi. To *Vibrio ordalii*-lignende isolater (NVIO 10593, NVIO 9225), et *Vibrio ordalii* isolat (NVIO 4827) og tre *Vibrio anguillarum* isolater (NVIO 10896, NVIO 10243, NVIO 8458) ble sådd på blod-agar skåler med og uten salt, og inkubert ved 22°C, for videre å benyttes til karakterisering. NVIO 10896 ble oppgitt som *Vibrio anguillarum*, men på grunn av kolonimorfologi og etterfølgende sekvensanalyse ble dette bekreftet å være et *Vibrio ordalii*-lignende isolat. Analyser som ble utført;

- Undersøke bevegelighet i lysmikroskop. Suspensjon ble laget av hvert isolat blandet med en dråpe fysiologisk saltvann på objektglass. Suspensjonen ble studert ved 100x. Bevegelige bakterier vil ha en klar synlig rettet eller kaotisk bevegelse, ubevegelige bakterier vil flyte rundt i væsken.
- Gram-farging. Metoden avgjør celleveggstruktur hos bakterier. En kombinasjon av krystallfiolett og jod gjør at de farges blåfiolett. Ved tilsetning av alkohol vil gram-negative bakterier avfarges og gram-positive bakterier beholde fargen som blåfiolett. Kontrastfarging med rødt fargestoff gjør at gram positive bakterier forblir blå-fiolett, mens gram-negative bakterier farges røde. Koloniene ble løst opp i fysiologisk saltvann, spredd utover objektglass, tørket og varmet over gassbrenner. Deretter ble bakteriefilmen farget som beskrevet over.
- Oksidativ/Fermentativ-test (OF-test). Avgjør evnen bakterier har til å produsere syre fra diverse sukkerarter, under anaerobe og aerobe betingelser. To rør per isolat med forgjæringsmedium bestående av glukose ble kokt og avkjølt. Rørene ble inokulert med bakteriene, deretter fikk ett av de to rørene per isolat satt inn en propp med parafinvoks for å unngå oksygen. Oksidativ metabolisme indikeres ved dannelse av syre, fargeomslag, i mediet med oksygen. Fermentativ metabolisme indikeres ved dannelse av syre, fargeomslag, uten tilgang på oksygen.
- Oksidase produksjon. En undersøkelse av tilstedeværelse av cytokrom oksidase C, et enzym involvert i elektronoverføring, og kan dermed redusere tetrametyl-p-fenylenediamine som resulterer i endret farge. En liten mengde bakteriekultur ble overført til et oksidase-strips med steril pøse. Ved oksidase positiv bakterie vil det dannes blåfarge på strips innen 30 sekunder.
- Vibriostat-sensitivitet. Følsomhetstest for vibriostat O/129. Isolatene ble sådd på agar-skål, og vibriostat-tabletter ble lagt over. Dette ble satt til inkubasjon ved 22°C. Hemmet

vekst rundt vibriostat-tablett tyder på sensitiv bakterie. Ingen hemming av vekst tyder på vibriostat resistent bakterie.

- Anaerob vekst. Vekst på skål etter inkubasjon anaerobt viser at bakterien vokser fakultativt anaerobt, altså både med og uten oksygen.
- Arginine, lysin, ornithine (ALO test). Avgjør evnen bakterien har til å metabolisere de ulike aminosyrene. Reagensrør med dekarboksylase base med arginin, lysin, ornithine adskilt i hvert rør ble laget til. En liten mengde kolonier av hvert isolat ble løst opp i væsken i individuelle rør. Toppen av hvert rør ble fylt med et tynt sterilt mineraloljelag. Rørene ble inkubert ved 22°C og undersøkt etter fem dager. Positiv reaksjon gir en dyp lilla farge på væsken. Negativ reaksjon vil ikke gi fargeendring, væsken forblir gul.
- Vekst med og uten 2% NaCl tilsatt blod-agar. Vekst ble undersøkt etter 24 timer, 48 timer og 72 timer. Isolatene ble sådd på blod-agar med og uten salt, for å observere foretrukket vekst-medie for bakteriene.

## 2.4 MALDI-TOF; Matrix-Assisted Laser Desorption Time Of Flight

Identifikasjon av alle isolatene ble utført ved hjelp av MALDI Biotyper CA system (Bruker Daltonics Inc., 2014). Isolatene ble dyrket på blodagar-skål (uten salt) ved 22 °C i 2-4 dager. En liten mengde bakteriekoloni ble overført til en stålplate med brønner, hvor isolatene må holdes separate i hver brønn. Bakteriene ble dekket med 1 µl matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic syre) og satt inn i MALDI Biotyper. Instrumentet bruker massespektrometri hvor mikroorganismens proteiner fragmenteres og ioniseres. Videre detekteres molekylmassen til de frie ionene i et vakuumkammer. Det spektrale proteinmønsteret til organismen bestemmes og sammenlignes med tusenvis av referansespekter av mikroorganismer som ligger i MALDI-TOF databasen (Gut, 2004, Nyberg et al., 2015). Instrumentet oppgir et forslag til den detekterte bakterien. Det blir angitt en «score value» som sier noe om hvor sikker identifikasjonen er. En score på  $> 2$  regnes som godt, pålitelig og sannsynlig identifisering, score mellom 1,70-1,99 regnes som relativt dårlig treff og mindre sannsynlig. Score på  $< 1,70$  betyr at identifisering ikke er mulig. MALDI-TOF ble gjennomført to ganger på samlingen av isolater, på grunn av *Vibrio ordalii* ikke lå inne i systemet ved første kjøring. Det *Vibrio ordalii*-lignende isolatet (NVIO 9225) ble lag inn i MALDI-TOF, som referansestamme, før andre kjøring.

## 2.5 DNA isolering (rensing)

Alle 38 templat (bakteriestammer) ble rensset for å få et rent nukleinsyreprodukt uten andre cellulære komponenter og DNA polymerase inhibitorer. Det ble først forsøkt å rense templatene

ved koking. 1µl bakterie ble oppløst i 200µl 1xPBS, videre kokt ved 98°C i 20 minutter. Blandingen ble sentrifugert ved 16.000 rcf (Relative Centrifugal Force/ G-force) i 3 minutter. Supernatanten ble overført til 1,5µl Eppendorf-rør. Produktet ble ikke rent nok ved rensing på denne måten. Derfor måtte DNA isoleres fra bakteriekulturene ved hjelp av «High Pure PCR Template Preparation Kit» utarbeidet av Roche Diagnostics. En liten mengde bakteriekoloni ble overført fra agar-skål til 1,5µl Eppendorfrør og tilsatt 200µl 1xPBS. Dette ble sentrifugert i 5 minutter ved 3000 rcf slik at bakteriene samles i en pellet på bunnen av røret. Supernatanten kastes ut, og det ble videre jobbet med «celle-pelleten». Pelleten ble igjen resuspendert med 200µl 1xPBS. Deretter ble egen protokoll for kit fulgt; «Isolation of Nucleic Acids from Bacteria or Yeast» side 9.

## 2.6 Bestemmelse av DNA kvalitet og DNA mengde (NanoDrop)

Etter isolering av DNA ble konsentrasjon og kvalitet målt for alle 38 templatene, ved hjelp av Thermo Scientific NanoDrop™ Spectrophotometer. Mengde DNA-innhold (nanogram/µl DNA) i hvert templat ble også målt. Instrument som benyttes bruker spektrofotometri og måler absorbans av molekyler ved en gitt bølgelengde i løsningen. Forholdet mellom absorbans ved 260nm og 280nm (260/280) brukes til å bestemme renheten/kvalitet av DNA. 260nm er bølgelengden hvor nukleinsyrer absorberer UV-lys. Mens 280nm er typisk hvor proteiner har sterk absorbans. Forholdet mellom absorbans ved 260nm og 230nm (260/230) brukes som en bekreftelse. 230nm er hvor organiske forbindelser ofte har sterk absorbans. 260/280 forholdet bør ligge mellom 1.8-2 for rent nok produkt. 260/230 forholdet kan ligge noe høyere, fra 2-2.2 (Thermo Fisher Scientific, 2005). Lavere verdier indikerer forurensing av proteiner, høyere verdier indikerer høyt innhold av RNA. Målinger av utvalgte templatere er vist i tabell 2.3. Templatene ble videre fortynnet og standardisert til 2 ng/µl DNA per rør.

Tabell 2.3 - Nukleinsyre konsentrasjon og 260/280,260/230 forhold hos utvalgte templatere med i studien, før fortynning

Sample ID (stamnummer)	Nucleic acid concentration	Unit	260/280	260/230	Sample type
NVIB 50-2373	96,8	ng/µl	2,01	2,13	DNA
NVIB 50-2374	73,4	ng/µl	1,97	2,11	DNA
NVIB 50-2656	84,1	ng/µl	2	2,02	DNA
NVIO 4827	15,2	ng/µl	2,01	2,18	DNA
NVIO 5283	58	ng/µl	1,86	2,27	DNA
NVIO 8179	59,8	ng/µl	1,82	1,99	DNA
NVIO 8189	47,2	ng/µl	2,02	2,08	DNA
NVIO 8656	91	ng/µl	1,93	1,98	DNA
NVIO 8713	84,7	ng/µl	1,95	2,25	DNA



## 2.7 16S rRNA sekvensering for identifikasjon

For å bekrefte fenotypi og MALDI-TOF resultater ble det foretatt 16S rRNA sekvensering av alle isolater, hele genet ble ikke sekvensert, men områder mellom primerpar. Dette gir som nevnt lav resolusjon, men fungerer godt for identifikasjon av art. Primere for 16S rRNA sekvensering er vist i tabell 2.4. Etter analyse og overensstemmelse av sekvenser, ble alle isolatene identifisert i Standard Nucleotide BLAST (NCBI 2019).

Tabell 2.4 - Primere brukt til 16S rRNA sekvensering av ca. 500 bp produkt, hentet fra Suau et al. 1999:

Primer navn	Primer sekvens (5'→3')	Amplikon størrelse (bp)	Kilde
S20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	500	Suau et al. 1999
A18	GWATTACCGCGGCKGCTG		

## 2.8 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon er en metode for eksponentiell amplifisering av et bestemt område av DNA uten hjelp av levende organismer, *in vitro*. Teknikken baseres på termiske sykluser med gjentatt oppvarming og nedkjøling (Saiki et al., 1988). En blanding av MasterMix (MM) og templat tilsettes brønner som passer i varmeblokk i PCR-instrumentet. MM inneholder blant annet termostabil DNA-polymerase og to komplementære primere som avgrensner området som skal kopieres opp. Grunnprinsippet med PCR er tre forskjellige temperatursteg som gjentar seg i 20-30 sykluser. Stegene kan modifiseres og ulike faktorer som størrelse på primere eller hvilken temperatur disse trenger for binding til templatet, kan spille en rolle. Ideelt sett bør hvert PCR-program optimaliseres for hver templat og primer kombinasjon som benyttes (Delidow et al., 1993).

Første steg i PCR-programmet er denaturering av DNA. Blandingen varmes opp til ca. 95°C vanligvis i 1-2 min, noen ganger lengre ved første syklus for å denaturere kromosomalt DNA. Dobbelttrådet DNA splittes til enkelttrådet DNA og primere kan senere festes til de enkle trådene.

Andre steg i prosessen er hybridisering (annealing) av primere. Temperaturen senkes til ca. 50-55 °C, avhengig av primerens smeltetemperatur ( $T_m$ ). Ved denne temperaturen festes primerne til enkelttrådet DNA. Sekvensspesifikke primere blir brukt, dermed bindes disse til et bestemt

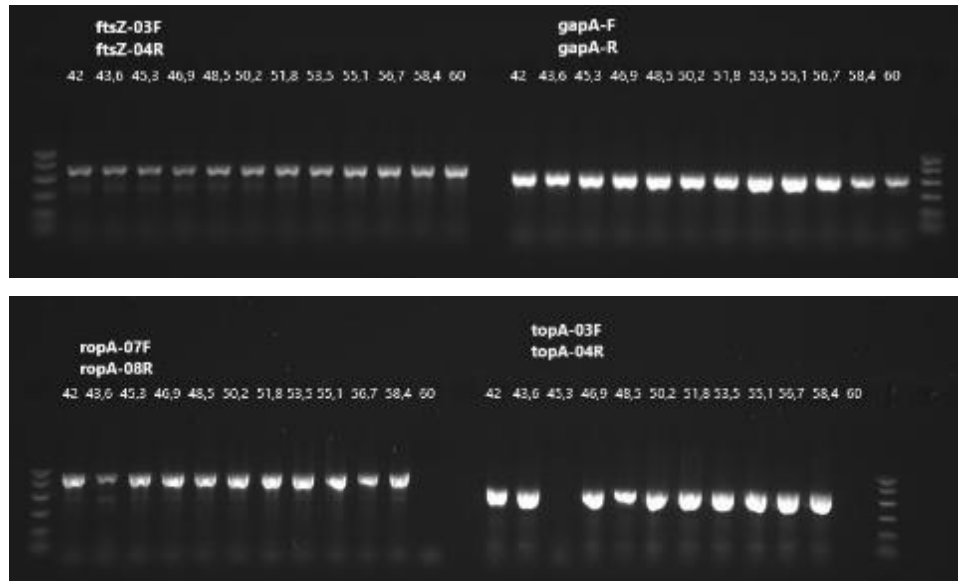
området på DNAet. Mindre sekvensspesifikke primere kan ofte ha en lavere hybridiseringstemperatur, fra 37-45 °C (Delidow et al., 1993).

Tredje steg er elongering, hvor nye DNA-tråder syntetiseres fra primerne. Temperaturen ligger rundt 72°C, som er optimal temperatur for *taq*-polymerasen. Polymerase er et enzym som syntetiserer nytt DNA. *Taq*-polymerase er varmestabil, og tåler derfor den høye temperaturen i PCR-reaksjoner. Forward og reverse primerne bindes til motsatt, komplementært enkeltrådet DNA, slik at begge tråder transkriberes samtidig. Amplifikasjon av nye DNA-tråder avhenger av lengden på sekvensen som skal amplifiseres (avstand mellom primerne) og polymerasens hastighet. Tilstrekkelig hastighet regnes ofte til 1 min/kb (Delidow et al., 1993).

### **2.8.1 PCR-amplifikasjon for MLSA/MLST**

PCR-amplifikasjon ble utført med 20 µl reaksjoner bestående av 16 µl MasterMix (MM) og 4 µl templat. MasterMix brukt i denne oppgaven utgjøres av en blanding av 0,1 µl GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase, 0,4 µl deoksynukleotider 10mM (dNTP mix), 1,5 µl magnesium klorid løsning, 25mM (MgCl<sub>2</sub>), 4 µl 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1 µl av hver av primerne og 8 µl nukleasefritt vann. For å få riktig mengde MM, må volumet ganges opp med antall prøver som skal kjøres. Samme betingelser ble utført for PCR-produkter til MLVA.

Før endelig PCR-program for MLSA/MLST ble bestemt, ble det utført temperaturgradient av alle primer-sett på PCR-maskinen på et utvalg isolater. Dette er for å bestemme hybridiseringstemperaturen som egnes best for primersettene og gir klare bånd på agarose-gel-bildet, vist i figur 2.1. PCR-instrumentet ble programmert med en gradient på 12 ulike temperatursteg fra 42 °C til 60 °C, med 1,5 °C sprang mellom hver gradient.



Figur 2.1 - Gel-bildet fra PCR-reaksjon med temperaturgradient av fire ulike primersett (*ftsZ*, *gapA*, *ropA* og *topA*). 55°C ble valgt å bruke for alle primerpar.

### 2.8.2 Endelig PCR-program for MLSA/MLST

PCR- syklus ble utført under følgende betingelser i Agilent Surecycler 8800; Syklusen startet ved 94 °C i 5 min, deretter 30 sykluser ved 94 °C i 0,5 min, 55 °C i 0,5 min, og 72 °C i 1 min. Til slutt 72 °C i 7 min.

### 2.8.3 Endelig PCR-program for MLVA

PCR- syklusen ble utført under følgende betingelser i Agilent Surecycler 8800; Syklusen startet ved 95 °C i 3 min, deretter 30 sykluser ved 95 °C i 1 min, 56 °C i 1 min, og 72 °C i 1 min. Til slutt 72 °C i 7 min.

## 2.9 Primere

Primere er små, korte fragmenter av enkelttrådet DNA eller RNA, også kalt oligonukleotider. Genomisk DNA kan bestå av mange millioner basepar. For deteksjon av riktige områder i genomet trengs primere. Primere består av 15-30 basepar (ofte rundt 20) og er komplementær for den sekvensen som skal detekteres. Det lille fragmentet er dermed i stand til å bindes til den delen av DNA-tråden som skal detekteres (Saiki et al., 1988). Ved en PCR-reaksjon brukes to primere, en i starten (forward-primer) og en i slutten (reverse-primer) av området som skal detekteres. Polymerasen kan syntetisere nye DNA-tråder når primerne bindes til templatet. Effektivitet og følsomhet av PCR-reaksjonen er i stor grad avhengig av effektiviteten av primerne, og valg av disse er svært viktig for å få tak i ønskede sekvenser (Abd-elsalam, 2003). Primere i oppgaven ble valgt på bakgrunn av tidligere publikasjon av Steinum et al 2016, listet opp i tabell 2.7. To av primerene i publikasjonen fungerte dårlig for *Vibrio ordalii*-lignende

isolater. For *gyrB* ble det designet nytt primersett, mens for *pyrH* var det nok å gjøre små endringer i det opprinnelige primersettet. Alle primerne ble bestilt med en M13 «hale». Dette er for at det skal kunne brukes samme primere ved sekvensering for alle genene, noe som gjør selve sekvenseringen mer effektiv. Sekvenser for M13 er vist i tabell 2.5.

Tabell 2.5 - Oversikt over M13 sekvenser festet i 3' endene til primere brukt i oppgaven

Primer navn	Primer sekvens (5'→3')	Amplikon størrelse (bp)	Kilde
Universal M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	500-1000	<a href="https://www.thermofisher.com">https://www.thermofisher.com</a>
Universal M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC		

### 2.9.1 Primerdesign

Gode primere er essensielt for en vellykket PCR-reaksjon. For at en oligonukleotid skal kunne fungere som en primer, er det flere faktorer det må tas hensyn til for mest mulig spesifikk og god amplifisering. Noen generelle retningslinjer bør følges ved primerdesign (Abd-elsalam 2003, Judelson, 2006);

1. Primer lengde; 18-30 nukleotider(nt) kan tas i bruk, men 20-24 nt pleier å fungere. Minimum 18 nt for å unngå problemer med sekundært hybridiseringssted på templatet.
2. G/C forhold; Forholdet bør ligge mellom 45-60%, avhengig av hvilken bakterie som undersøkes. G/C forhold, smeltetemperatur ( $T_m$ ) og anealingtemperatur ( $T_a$ ) er strengt avhengig av hverandre.
3. Smeltetemperatur ( $T_m$ ); Forskjell i  $T_m$  for to primersett bør ikke være større enn 5 °C, helst så nær som mulig. Optimal smeltetemperatur for primere ligger ofte mellom 52-58 °C.  $T_m$  kan justeres ved å legge til eller trekke fra baser i primererekvensene.
4. Anealings-/hybridiseringstemperatur ( $T_a$ );  $T_a$  bør ligge 5 °C lavere enn kalkulert  $T_m$ .
5. GC innhold nær 3'enden bør være lavere enn ved 5'enden. Høyt G/C innhold ved 3'enden kan potensielt føre til hybridisering på flere steder langs templatet.
6. Fordeling av nukleotider; Langs primerens lengde er det viktig med god fordeling av de 4 nukleotidene. Lange rekker av samme baser eller baser som binder sterkt (G og C)/baser som binder svakt (A og T) må unngås. Ideelt sett skal primeren ha en vilkårlig miks av nukleotider.
7. Hårnålsformasjoner; Primere bør ikke inneholde komplementære sekvenser i seg selv, at sekvensen leses likt begge veier. Primeren vil da kunne foldes tilbake på seg selv, kalt hårnålsformasjon, og føre til feil resultater.

8. Primer-dimer formasjon; Primere bør ikke inneholde nukleotidsekvenser som gjør det mulig for et primer molekyl å hybridisere til seg selv eller til andre primere som benyttes i PCR reaksjonen.

### 2.9.2 Primerdesign for MLSA/MLST og Virulensgener

Primerdesign ble utført med utgangspunkt i retningslinjene nevnt over når spesifikke primersett for *gyrB* genot ble laget. Primersekvenser for *gyrB*-genet fra publikasjonen til Steinum et al. 2016 avvikte fra sekvenser for *gyrB*-genet i referansestammen som ble brukt i oppgaven for *Vibrio ordalii* (FF-167 ATCC-33509) og *Vibrio anguillarum* (ATCC-68554) (Steinum et al., 2016). For å designe spesifikke primersett ble ti tilgjengelige sekvenser for *gyrB* av *Vibrio anguillarum* (VIB 605, VIB 266B, VIB 253, VIB 149, VIB 127, VIB 77, VIB 64, Se-1/1, NVI 6419, NVI 6409) og ti sekvenser for *gyrB* av *Vibrio ordalii* (SPRF 238, SPRF 144, NVI 5918, NVI 5286, NVI 5191, NVI 5190, NVI 5087, NVI 5084, NCIMB 2168, FALF 93) hentet fra National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Gen-sekvensene ble lagt inn i Geneious® 11.1.5 hvor det ble laget en Multiple-MUSCLE alignment (Geneious® 11.1.5, 2018). Sekvensene ble sammenlignet med hverandre og område med mye variasjon mellom gen-sekvensene ble detektert. Primerdesign ble utført i ytterkantene av det variable området. Området i sekvensene hvor primere designes må være helt konserverte mellom isolatene. Avstanden mellom forward og reverse primer bør ligge rundt 400-500 bp, og alle kriterier for gode primere bør være oppfylt for gode PCR- resultater. Navnet primersettet har fått *gyrB\_F 738/gyrB\_R 1169* indikerer hvor på genot primerne er festet. *pyrH* primersettet fungerte ikke for *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Det måtte derfor gjøres modifikasjoner for å tilpasse alle isolatene. En base i primersekvensen for *pyrH* fra Steinum et al. (2016) ble byttet ut med R, kalt degenerert base, som står for basene A eller G. Dette er for at primeren skal passe alle isolatene.

Det ble også designet primere for flere virulensgener. Aktuelle gener ble hentet fra tidligere publikasjon av Naka et al., (2011), hvor det var gjort helgenomsekvensering av *Vibrio anguillarum* isolater og et *Vibrio ordalii* isolat. Virulensgenet som ble valgt, *RTX* (repeat in toxic), var til stede i alle de sekvenserte isolatene fra denne studien. Videre ble dette undersøkt i gensekvenser hentet fra genbank (NCIMB) for referansestammene *Vibrio ordalii* (FF-167 ATCC-33509) og *Vibrio anguillarum* (ATCC-68554) i MEGA 7 (Kumar et al., 2016), hvor *RTX*-sekvensen ble funnet. Samme prosedyre ble utført for hemolysin-genet, som også var tilstede i undersøkte isolater fra Naka et al., (2011), og som ble funnet i gensekvenser hos

referansestammene i forbindelse med denne studien. Det ble også hentet inn andre tilgjengelige helgenomsekvenser av bakteriene via genbank for undersøkelse. Referansestammer av *Vibrio ordalii* fra Stillehavsområdet ble brukt.

### 2.9.3 Primerdesign for MLVA

Helgenomsekvens av et *Vibrio ordalii*-lignende isolat fra Norge (NVI 5290) ble lagt inn i Tandem Repeats Finder Program (TRFP) (Benson, 1999). Helgenomsekvensering ble utført av Andreas Riborg ved Veterinærinstituttet i Oslo, sekvensene er ennå ikke publisert. TRFP identifiserer og lister opp en rekke sekvenser som inneholder repeterende enheter. Områder ble valgt på bakgrunn av «Period size of the repeat» mellom 5-10 og “Percent of matches between adjacent copies overall” til 100. Helgenomsekvensen ble lagt inn i Geneious®11.1.5 hvor områdene med repeterende sekvenser ble søkt opp. Primer design ble utført i ytterkantene av områdene oppgitt i TRFP. Produktet skal helst ligge rundt 200 bp. Det ble til sammen designet ti primersett, i tillegg ble det inkludert to primersett tilsendt av Duncan Colquhoun fra Veterinærinstituttet, upublisert studie. Fire egendesignet primere og to tilsendte primere ble tatt i bruk for MLVA analysen vist i tabell 2.6.

Tabell 2.6 - Oversikt over VNTR-primere brukt i MLVA-analysen, med primer sekvenser, amplikon størrelse og kilder

Primer navn	Primer sekvens (5'→3')	Amplikon størrelse (bp)	Kilde
VNTR-1-F	TGGTTTGGTGTGAGCATC		Upublisert studie
VNTR-1-R	CGGCATACGTAAAAATGGTG		
VNTR-6-F	GCTCAGCATAAATTTGGAAATCG		Upublisert studie
VNTR-6-R	TTGATTTGGATCGGAAGGCT		
VNTR-8-F	GGTGACCATGACCATGACCA	152	Denne studien
VNTR-8-R	AGAGAAAGTCAAGGCATCGGC		
VNTR-9-F	GTCATGGTGTGCGTGTGAG	181	Denne studien
VNTR-9-R	CGCTCCAGCCAAATGTCATT		
VNTR-12-F	TGAGCTGCGAAAGGTGGATT	190	Denne studien
VNTR-12-R	TCCGATGGATCGCATGTGAA		
VNTR-15-F	AGTGCTTGTTTTGGTGTGTT	204	Denne studien
VNTR-15-R	CTCTGACAAATGATAGCCACCT		

## 2.10 Husholdningsgener

Valg av husholdningsgener ble basert på Steinum et al. (2016), på bakgrunn av tidligere MLSA studier av *Vibrio*-arter (Thompson et al., 2005, Thompson et al., 2007). Henholdsvis *atpA*, *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *rpoA*, *topA* og *pyrH* ble benyttet. Genene er nøye testet for seleksjonspress, med kodon basert Z-test for hvert lokus. P-verdier for genene ligger mellom 0 - 0,004, dvs. signifikant lavere enn 1 ifølge Steinum et al. (2016). Dette beregnes ut fra dN/dS ratio beskrevet tidligere. Genene er derfor under «purifying» seleksjon og godt egnet for MLSA (Steinum et al., 2016). Alle aminosyresekvensene for hvert gen i denne studien ble manuelt undersøkt for dette, og dN/dS ratio ble regnet ut (*topA* = 0,18; *ropA* = 0,21; *pyrH* = 0; *mreB* = 0,06; *gyrB* = 0,22; *gapA* = 0; *ftsZ* = 0; *atpA* = 0). Det er også vist at genene finnes som kun en kopi i både *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* (Thompson et al., 2005, Thompson et al., 2007). Kriterier for husholdningsgener er nevnt i kap.1.12.4. Gener brukt i denne studien, primer navn, primer sekvens samt størrelse før og etter PCR amplikon og trimming er listet opp i tabell 2.7.

Tabell 2.7 - Oversikt over husholdningsgener brukt i analysene i oppgaven, beskrivelse av genfunksjon, primer navn, primersekvens, samt størrelse før og etter PCR amplifikasjon.

Genlokus	Beskrivelse	Primer navn	Primer sekvens (5'→3')	Amplikon størrelse (bp)	Størrelse etter PCR-amplikon og trimming (bp)	Kilde
<i>atpA</i>	ATP syntase	Vib-atpA-05-F	TCATTCGCATTCACGGCCTA	1247	516	Steinum et al. 2016
	A subenhet	Vib-atpA-06-R	CGCTCTGCCGCAAAGATAA			
<i>ftsZ</i>	Celledelingsprotein	Vib-ftsZ-03-F	TTGGTGGTGGTCCGGTAA	678	456	Steinum et al. 2016
		Vib-ftsZ-04-R	TTGCCATCTCTGCCGCTT			
<i>gyrB</i>	DNA gyrase	gyrB_738F	GCGTGACGATGGGATTACC	453	405	Denne studien
	subenhet B	gyrB_1169R	CCTTTACGACGTGTCATTTTCCAC			
<i>mreB</i>	Stavform bestemmende protein	Vib-mreB-F	AAGCGTTGCTGCTGTCGGTC	672	495	Steinum et al. 2016
		Vib-mreB-R	GCAACCATCACCGCAGAAAC			
<i>pyrH</i>	Uridylat kinase	Vib-pyrH-05-F	AGCCTATCAACGTATCCTGT	587	399	Steinum et al. 2016
		Vib-pyrH-06-R	CARGTCCATCACTTTTAGCT			
<i>ropA</i>	RNA polymerase alfa subunit	Vib-ropA-07-F	TCTTAAGCCACGTCTTGTTG	919	744	Steinum et al. 2016
		Vib-ropA-08-R	AGATAGACCACGTGATGCAA			
<i>topA</i>	Topoisomerase I	Vib-topA-03-F	CAATCCAACAAGCCTTCCAA	621	393	Steinum et al. 2016
		Vib-topA-04-R	CGGATTCTCAGGTAAGTAGGCTT			
<i>gapA</i>	Glyceraldehyd-3-forfat dehydrogenase	Vib-gapA-F	AACAGGTCTATTCCTAGACGA	570	483	Steinum et al. 2016
		Vib-gapA-R	CCGATGAAGTCTTGAGAAAC			

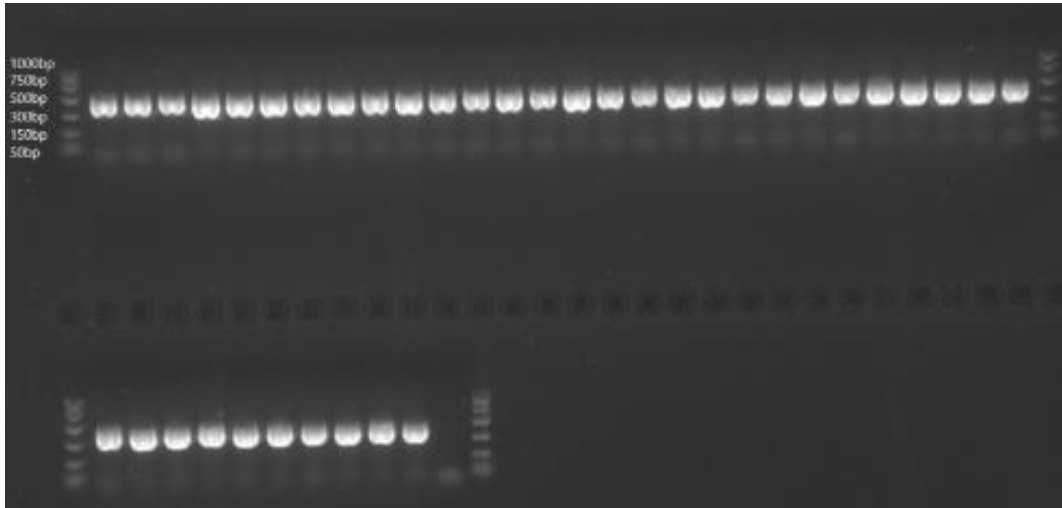
## 2.11 Agarose gel-elektroforese

For visualisering av PCR-produkt ble gel-elektroforese benyttet. Prinsipielt er det et elektrisk felt for separasjon av DNA-fragmenter i en agarose gel som baseres på fragmentenes størrelse. Hver ende av elektroforesekaret som gelen blir plassert i har en elektrodebuffer, med en negativ og en positiv pol. Elektrisk spenningsforskjell gjør at negativt ladete molekyler, DNAet, vandrer mot den positive polen. Vandringshastigheten avgjøres av ulike faktorer som porestørrelse i gel som bestemmes av konsentrasjonen av agarose, tid, størrelse på molekylet og spenning som er koblet til. DNAet vil dermed sorteres i bånd, hvor store molekyler vandrer tregere gjennom gelen enn små molekyler, basert på basepar.

### 2.11.1 Agarose-gel-elektroforese MLSA/MLST

Gel ble laget av 100ml 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer tilsatt 1 gram (1%) SeaKem® LE Agarose. Agarose ble løst opp i buffer ved koking av blandingen i mikrobølgeovn i ca.1 minutt. 10µl GelRed® Nucleic Acid Gel Stain ble tilsatt blandingen, et ekstremt følsomt og stabilt fluoriserende fargestoff som farger nukleinsyrer i agarosegeler. Blandingene ble overført til et støpekar med «kammer», og stod i ca.30 minutter for å stivne til gel. «Kammene» ble tatt ut, og det var dannet brønner i gelen. Videre ble gelen overført til elektroforesekaret og dekket av 1XTBE-buffer. 3µl PCR-markør som inneholdt en blanding av 2µl 6X Loading dye og 10µl PCR markers, ble tilsatt første og siste brønn. Dette er en størrelsesmarkør for å kontrollere at PCR-produktet er forventet størrelse. PCR-markør brukt i oppgaven kan måle DNA fragmenter av størrelsene 50, 150, 300, 500, 750 og 1000 basepar (bp). Størrelsene er presentert med lik intensitet vist i figur 2.2. Det ble manuelt pipettert 4µl PCR-produkt i hver enkelt av de resterende brønnene. Elektrodebuffer på 120 volt i 20 minutter ble koblet til. For å visualisere resultatene, bekrefte effektiv reaksjon og rent produkt ble Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System tatt i bruk, vist i figur 2.2. Maskinen tar bilde av gelen ved hjelp av UV-lys.





Figur 2.2 - Visualisering av PCR-produkter fra agarose gel ved Gel Doc™. Oversikt over alle isolater med i oppgaven utført med pyrH-primer. pyrH skal være 589bp, som kan leses av markøren at stemmer. Siste brønn er negativ kontroll.

### 2.11.2 Agarose gel-elektroforese MLVA

Gel ble laget av 100ml 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer med 2 gram (2%) SeaKem® LE Agarose. Samme prosedyre for tillaging av agarose-gel for MLSA/MLST ble fulgt. Grunnen til at det blir tilsatt 2% Agarose er for å minske porestørrelsen i gelen. Mindre porestørrelse gjør at vandingshastigheten for DNA-molekylene blir lavere og dermed lettere å lese av båndstørrelse, når små marginer skiller forskjeller i båndstørrelse. Det ble tilsatt 4µl PCR-produkt, hvor hver 5. brønn ble tilsatt 2µl PCR-markør for enklere avlesning av DNA-størrelse. Det ble brukt samme PCR-markør (50bp-1000bp) som for MLSA/MLST. Elektrodebuffer ble koblet til ved 60 volt i 60-70 minutter. På samme måte som for MLSA/MLST ble Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System tatt i bruk, ved hjelp av UV-lys.

For MLVA ble det ikke benyttet DNA-sekvensering, slik som for MLSA/MLST. Båndstørrelse av DNA-fragmenter i agarose-gel ble bedømt, og på den måten fikk hvert isolat tildelt et nummer for hver unike bånd-lenge for hver av VNTR-ene. Dette ble slått sammen, og hver unik sammensetning fikk et eget nummer (VNTR-type). Dette ble utført i excel, og videre importert til BioNumerics 7.6 (BioNumerics 7.6, 2019), hvor det ble konstruert et «Minimum spanning tree» (MST). MST er en algoritmisk metode som beskriver grad av ulikheter blant isolater gjennom parvise avstandsmatriser. MST representerer et sett med forbindelser som knytter sammen isolater med kortest mulig avstand. Metoden fungerer best når slektskap mellom

organismer over kort tid skal studeres (Salipante and Hall, 2011). *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet og seks forskjellige VNTR-loki ble benyttet i analysen.

## 2.12 DNA-Sekvensering

DNA-sekvensering ble utført av MBE laboratoriet ved VI Oslo. Sanger sekvensering ble brukt som sekvenseringsmetode.

### 2.12.1 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering bruker en DNA-polymerase som lager en kopi av et DNA-templat. Primere bestemmer hvor selve kopieringen skal begynne. En blanding av fire deoksyribonukleosidtrifosfater(dNTP); dATP, dTTP, dCTP og dGTP sammen med deres analoger, dideoksynukleosidtrifosfater(ddNTP); ddATP, ddTTP, ddCTP og ddGTP brukes som byggesteiner for in vitro kopiering av DNA i et bestemt forhold (Sanger and Nicklen, 1977). ddNTP-ene mangler hydroksylgruppen i 3' enden og er merket med hver sin fluoriserende farge. Dette er en modifisert variant av Sangersekvensering. Den fluoriserende fargen innføres i den voksende DNA-tråden i konkurranse med de tilsvarende «normale» dNTP-ene. Voksende DNA-tråder som får satt inn ddNTP, slutter å vokse. Dette resulterer i dannelse av en rekke DNA-fragmenter med start i samme primersete og avsluttes med fluoriserende ddNTP. Rekkefølgen av basene i DNA-templatet vil avgjøre hvilken posisjon ddNTP innføres og videre størrelsen på DNA-fragmentene som lages. Fragmentene kan analyseres ved å skilles fra hverandre i en elektroforese hvor baserekkefølgen i DNA-tråden identifiseres (Veterinærinstituttet, 2019).

### 2.12.2 Sekvenseringsutførelse

Pipetteringsrobot, Biomek4000, ble benyttet til rensing av PCR-produkter med AMPure®/BigDye Terminator v3.1. Rutinemessig brukes gel-bildet fra PCR-produkt til å justere templatmengde i sekvenseringsreaksjonen, basert på bånd intensitet. Reaksjonen for sekvensering settes opp i 96-well reaction plate, med følgende løsninger pr. sekvenseringsreaksjon (10µl reaksjonsvolum):

- 0,5µl BigDye Terminator v3.1
- 2,0µl 5X Sequencing buffer
- 2,0µl 2,5µM primer (M13)
- 2,0µl Renset PCR-produkt
- 3,5µl MilliQ-vann

Sekvensering av PCR-produkter ble utført ved hjelp av Applied Biosystems® 3500xl Genetic Analyzer (Foster City, CA).

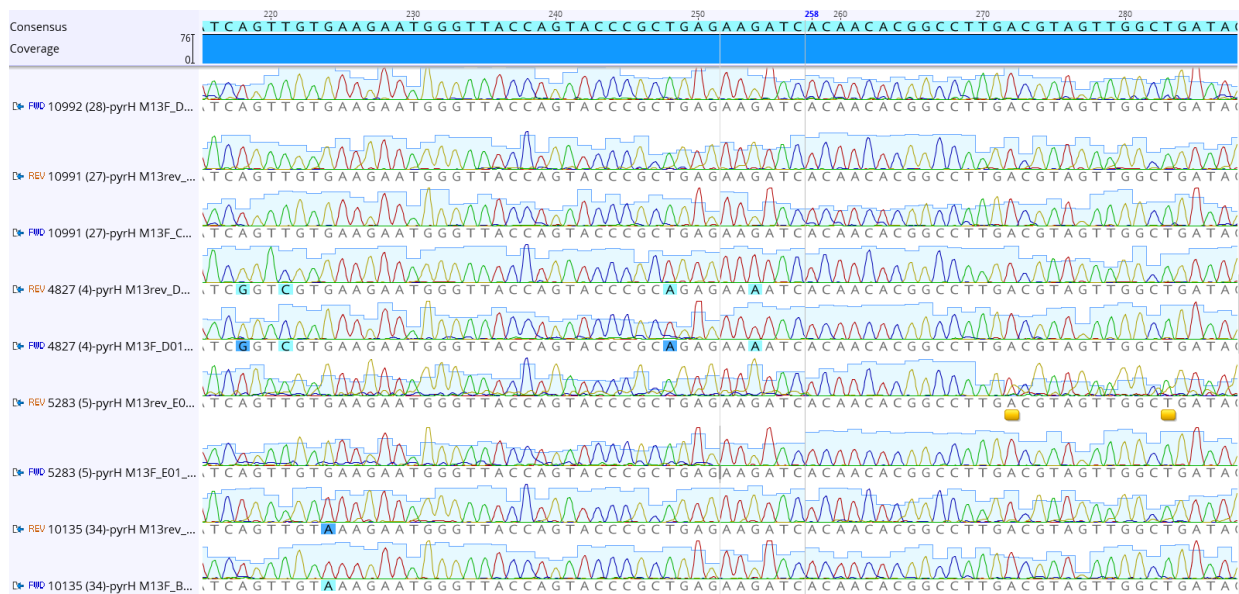
### Sekvenseringsprogram

Tabell 2.8 - Program for BigDye reaksjon for PCR-produkter benyttet

Temperatur	Tid (min)	Antall sykluser
96°C	01:00	
96°C	00:10	
50°C	00:05	X 25
60°C	04:00	
4	∞	
<b>Estimert tid</b>	<b>2 timer</b>	

#### 2.12.3 Behandling av sekvenser

Sekvensdata ble lagt inn i Geneious® 11.1.5 hvor sekvenskromatogrammene for pluss og minus (forward og revers) DNA-tråder for hvert gen og isolat ble sammenstilt. Alle sekvenser ble gjennomgått manuelt for å sikre overensstemmelse mellom forward og reverse sekvenser, og at trådene var komplementær i forhold til hverandre (fig.2.3). Kromatogrammene må ha fine topper for at programmet er sikker på hvilken base som er sekvensert. Uklare 5' eller 3' ender ble klippet bort. Noen steder på DNA-trådene var det oppgitt eksempelvis K, S eller R. Programvaren er da usikker mellom to baser. K kan være G eller T, S kan være C eller G osv. Da er det viktig å sammenligne den komplementære tråden, om denne tråden er sikker på hvilken base dette er, kan en med relativt høy sikkerhet bestemme basen. Når overensstemmelse mellom pluss og minus DNA-tråd (konsensussekvenser) var oppnådd, ble sekvensene klippet til slik at hver sekvens for hvert gen var like lange. Primererekvensene er ikke tatt med i analysen, kun sekvensene mellom primerpar. Alle sekvenser ble trimmet til samme lengde og justert til riktig leseramme i Geneious® 11.1.5.



Figur 2.3 - Sekvenskromatogram for pluss og minus DNA-trådene for et utvalg av isolater med i oppgaven, fra programmet Geneious 11.1.5). Uthevede baser i blått er ulik fra konsensus. Gule bokser betyr at basen er endret.

### 2.12.3.1 MLSA

Etter sekvensbehandling i Geneious® 11.1.5 ble hver sekvens for hvert gen og isolat lagt inn i excel. Alle åtte gensekvenser (trimmet: *atpA* = 516 bp; *topA* = 393 bp; *ropA* = 744 bp; *pyrH* = 399 bp; *mreB* = 495 bp; *gyrB* = 405 bp; *gapA* = 483 bp; og *ftsZ* = 456) ble satt sammen til en lang sekvens for hvert enkelt isolat (Tab.2.9), som til sammen ble 3891 bp.

Tabell 2.9 - Viser noen av isolatene i analysen med sekvenser for hvert av husholdningsgenene (8 stk)

Stamme nr.	<i>atpA</i>	<i>mreB</i>	<i>ropA</i>	<i>topA</i>	<i>gapA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>pyrH</i>	<i>gyrB</i>
NVIB 50-2373	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC
NVIB 50-2374	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC
NVIB 50-2656	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC
NVIO 4827	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC
NVIO 5283	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC
NVIO 8171	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC
NVIO 8179	CAACGTGAAC	GATTCTACG	GGCCATACTC	AAAGTGGCGC	ATCACTGCTG	GATGCAGCTC	TTAGATCGCA	GTGGCGATGC

Sammensatte sekvenser (alignment) ble lagt inn i Geneious® 11.1.5 for videre å utforme fylogenetiske ML-trær. Alignment av isolater og gener konstruert i Geneious® 11.1.5, ble eksportert til MEGA 7 hvor konstruksjon av fylogenetiske trær til MLSA ble gjort (Kumar et al. 2016). Programmet konstruerer fylogenetiske fremstillinger gjennom «Maximum Likelihood» (ML) estimering, hvor treet med høyest log likelihood blir benyttet. Kimura 2 parameter (K2 G+I) ble brukt som substitusjonsmodell og beskriver graden av endring fra et nukleotid til et annet (Kimura, 1980). K2 G+I ble identifisert til å være den mest passende substitusjonsmodellen ved hjelp av «Find best-fit substitution-model (ML)». G+I beskriver

grad av endring mellom plasser i en sekvens. ML estimering er en statistisk metode som bruker standardiserte statistiske teknikker for beregning av sannsynlighetsfordelinger, og videre tildele sannsynligheter til bestemte fylogenetiske trær (Chor and Tuller, 2005). Kjernen i metoden er en enkel «hill-climbing» algoritme som justerer tre-topologi og gren lengder samtidig. Algoritmen starter med et innledende tre som konstrueres ved rask distanse-basert metode og modifierer dette treet for å forbedre sannsynligheten ved hver gjentakelse (Guindon and Gascuel, 2003). ML-metoden finner verdiene til modellparameterne som maksimerer sannsynlighetsfunksjonen. Intuitivt vil parametere da blir valgt som gjør dataene mest sannsynlig. Bootstrap-verdi (antall repetisjoner) ble satt til 500. Fylogenetiske trær ble konstruert individuelt for alle åtte genene (vedlegg, Fig.5.2-5.5) og som sammensatt sekvens (Fig.3.5).

### 2.12.3.2 MLST

MLST-excelark utarbeidet av Snorre Gulla (Veterinærinstituttet) ble benyttet. Alle ulikheter i alleler mellom hver gensekvens for hvert isolat ble langt inn (Tab.2.10). Programmet regnet ut antall ulike sekvenstyper (ST) til stede. Data fra grønt felt («automatisk annotation») i MLST-excelark ble importert til BioNumerics 7.6, hvor «Minimum Spanning Tree» ble benyttet for estimering av slektskap.

Tabell 2.10 - Variabler i alleler for hvert isolat og hvert gen lagt inn i MLST-excelarket. ST er beregnet på bakgrunn av disse variablene. Et utvalg av stammer er med i tabellen.

Variable punkter													automatisk annotation												
stamme	ropA	AT_ropA	gyrB	AT_topA	AT_topA	pyrH	AT_gapA	AT_ftsZ	AT_ftsZ	mreB	AT_atpA	AT_sum AT	ST	ropA	gyrB	topA	pyrH	gapA	mreB	atpA	ftsZ				
2																									
3	NVIB 50-2373	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
4	NVIB 50-2374	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
5	NVIB 50-2656	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
6	NVIO 4827	CAAATG	2 TCAATATA	2 TCTCCG	2 CGGCTCG	2 TTATTGACTT	2 CGTTAACATG	2 TCGCCCGG	2 ATAACAAT	1 22222212	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
7	NVIO 5283	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
8	NVIO 8171	CAGACA	3 CCCACGCT	3 TATCTG	3 TGGCCACA	3 TAGACTGCTT	3 CAATTGTGCA	3 CAGTCTGG	3 ATAACAAT	1 33333313	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
9	NVIO 8179	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
10	NVIO 8189	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
11	NVIO 8458	CAGACA	3 CCCACGCT	3 TATCTG	3 TGGCCACA	3 TAGACTGCTT	3 CAATTGTGCA	3 CAGTCTGG	3 ATAACAAT	1 33333313	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
12	NVIO 8656	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
13	NVIO 8713	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
14	NVIO 8730	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
15	NVIO 8732	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
16	NVIO 9109	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
17	NVIO 9223	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
18	NVIO 9225	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
19	NVIO 9260	CAGACA	3 CCCACGCT	3 TATCTG	3 TGGCCACA	3 TAGACTGCTT	3 CAATTGTGCA	3 CAGTCTGG	3 ATAACAAT	1 23333323	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
20	NVIO 9361	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	4 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 114111111	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1			
21	NVIO 9379	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
22	NVIO 9421	GGACCA	1 CCCATGCT	1 ACTTCGG	1 CGGCCACA	1 CTATCTGCG	1 AATAAACATG	1 CAGTCCGAC	1 ATAACAAT	1 111111111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
23	NVIO 9754	CAGACA	3 CCCACGCT	3 TATCTG	3 TGGCCACA	3 TAGACTGCTT	3 CAATTGTGCA	3 CAGTCTGG	3 ATAACAAT	1 23454444	5	2	4	5	4	4	4	4	4	4	4	4			

## 3 Resultater

### 3.1 Fenotyping

Alle resultater fra fenotyping er listet opp i tabell 3.1. Isolater inkludert i denne studien er karakterisert av Veterinærinstituttet i forkant av studiet.

NVIO 9225 og NVIO 10583 er karakterisert som *Vibrio ordalii*-lignende isolater isolert fra syk rognkjeks i Norge. Fenotypiske tester støtter dette, med små ikke hemolytiske kolonier uten lukt, samt negativ arginin test. Isolatene var uten farge, noe som skiller dem fra *Vibrio ordalii* (Colquhoun et al., 2004). Gram-farging av NVIO 9225 vises i figur 3.1.

NVIO 4827 karakterisert som *Vibrio ordalii*, isolert fra syk laks i Chile. Størrelsen og utseende på koloniene hos dette isolatet var likt som for NVIO 9225 og NVIO 10593, med unntak av en kraftig hvit/grå farge (fig 3.2). Kolonimorfologi og andre biokjemiske egenskaper for chilensk *Vibrio ordalii* er beskrevet av Colquhoun et al., (2004), som bekrefter observasjoner i denne studien.

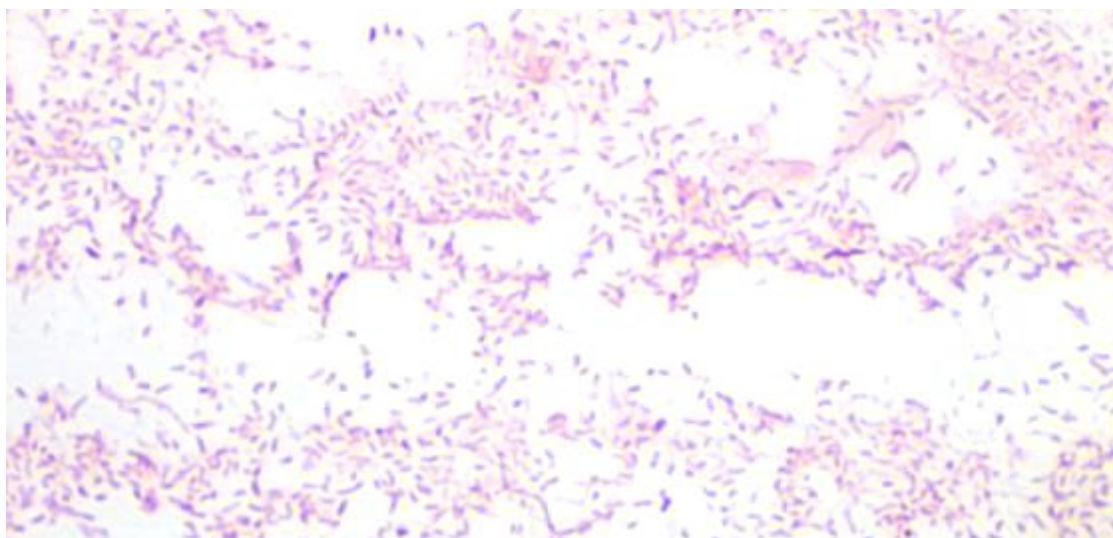
NVIO 9754 er karakterisert som *Vibrio anguillarum* O2a. Fenotypiske tester støtter dette. Ingen registrering av vekst etter 72-96 timer, dette er på grunn av tilstrekkelig vekst etter 48 timer. For ALO-test hvor L = (÷) er oppgitt, var det observert en lys lilla farge, altså svakt positivt resultat, noe som er forenlig med *Vibrio anguillarum* O2a biotype (pers. kom. Duncan Colquhoun). Sterk lukt ble også registret. Gram-farging av bakterien er vist i figur 3.3.

NVIO 8458 er karakterisert som *Vibrio anguillarum* O1. Fenotypiske tester støtter opp om dette. Ingen registrering av vekst etter 72-96 timer som skyldes tilstrekkelig vekst etter 48 timer. Koloniene var noe større med sterkere hemolyse enn NVIO 9754. Sterk lukt ble også registret.

NVIO 10896 var oppgitt som *Vibrio anguillarum*. Fenotypiske tester støtter ikke dette. Bakteriekoloniene var små, vokste tregt, ingen hemolyse, uten lukt eller farge med negativt arginin test. Noe som er forenlig med *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Kolonimorfologi er vist i figur 3.4.

Tabell 3.1 - Resultater av fenotypiske tester (vertikal kolonne) utført på isolatene NVIO 9225, NVIO 10593, NVIO 4827, NVIO 9754, NVIO 8458 og NVIO 10896 (horisontale kolonner).

Fenotypiske tester	NVIO 9225	NVIO 10593	NVIO 4827
Koloni egenskaper	Små, lyse/gjenomsiktige kolonier	Små, lyse/gjenomsiktige kolonier	Små, hvite kolonier
Vekst etter 24t (blod agar u/2% NaCl)	ingen	ingen	ingen
Vekst etter 24t (blod agar m/2% NaCl)	ingen	ingen	ingen
Vekst etter 48t (blod agar u/2% NaCl)	Lite, små kolonier kan skimtes	Lite, små kolonier kan skimtes	Lite, små kolonier kan skimtes
Vekst etter 48t (blod agar m/2% NaCl)	Lite, små kolonier kan skimtes	Lite, små kolonier kan skimtes	Lite, små kolonier kan skimtes
Vekst etter 72-96t (blod agar u/2% NaCl)	God vekst	God vekst	God vekst
Vekst etter 72-96t (blod agar m/2% NaCl)	God vekst	God vekst	God vekst
Bevægelighet	Klar kaotisk bevegelse, små korte staver	Klar kaotisk bevegelse, små korte staver	Klar kaotisk bevegelse, små korte staver
Gran-farge	Gran-negativ	Gran-negativ	Gran-negativ
OF-test	(+)	(+)	(+)
Vibrostat sensitivitet	+	+	+
Anaerob vekst	Fakultativ anaerob	Fakultativ anaerob	Fakultativ anaerob
ALO-test	÷	÷	÷
Oksidase produksjon	+	+	+
	NVIO 9754	NVIO 8458	NVIO 10896
Koloni egenskaper	Store, grå, hemolytiske kolonier	Store, gråaktige, hemolytiske kolonier	Små, lyse/gjenomsiktige kolonier
Vekst etter 24t (blod agar u/2% NaCl)	Store, grå, hemolytiske kolonier	Store, gråaktige, hemolytiske kolonier	Ingen
Vekst etter 24t (blod agar m/2% NaCl)	Lite, kan så vidt se noen kolonier	Lite, kan så vidt se noen kolonier	Ingen
Vekst etter 48t (blod agar u/2% NaCl)	Lite, kan så vidt se noen kolonier	Lite, kan så vidt se noen kolonier	Lite, små kolonier kan skimtes
Vekst etter 48t (blod agar m/2% NaCl)	God vekst	God vekst	Lite, små kolonier kan skimtes
Vekst etter 72-96t (blod agar u/2% NaCl)	God vekst	God vekst	God vekst
Vekst etter 72-96t (blod agar m/2% NaCl)	God vekst	God vekst	God vekst
Bevægelighet	Klar kaotisk bevegelse, små og korte staver	Klar kaotisk bevegelse, små og korte staver	Klar kaotisk bevegelse, små korte staver
Gran-farge	Gran negativ	Gran negativ	Gran-negativ
OF-test	+	+	(+)
Vibrostat sensitivitet	+	+	+
Anaerob vekst	Fakultativ anaerob	Fakultativ anaerob	Fakultativ anaerob
ALO-test	A = + L = (÷) O = ÷	A = + L = ÷ O = ÷	÷
Oksidase produksjon	+	+	+

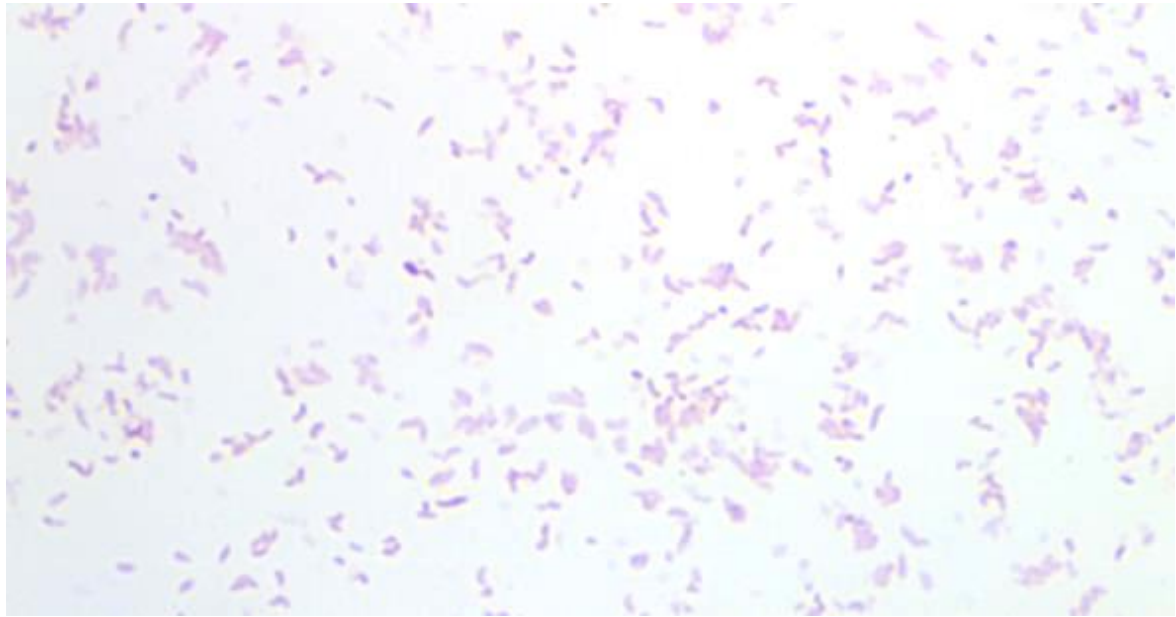


*Figur 3.1 – Gram-farget NVIO 9225 Vibrio ordalii-lignende. Bildet er tatt i lysmikroskop, forstørrelse 100x av Lisa Øvredal*

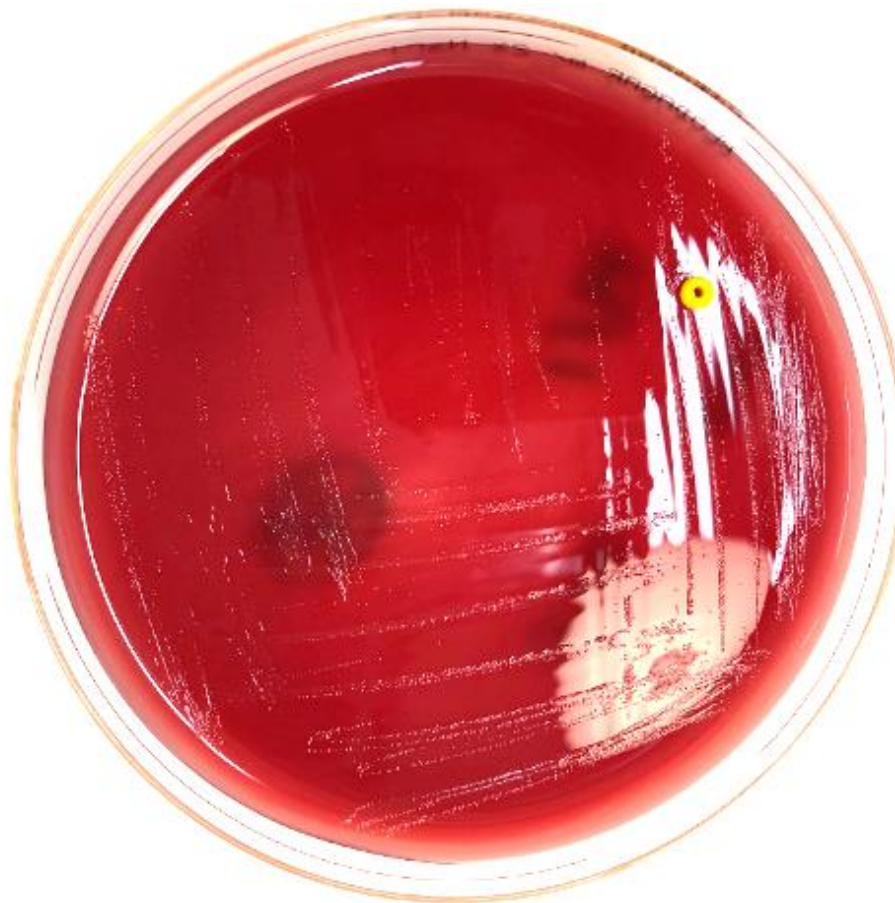


*Figur 3.2 – NVIO 4827 Vibrio ordalii. Hvit/grå farge kan skimtes. Dyrket på blod-agar 2% NaCl i 4 dager ved 22°C. Foto: Lisa Øvredal*





*Figur 3.3 – Gram-farget NVIO 9754 Vibrio anguillarum. Bildet er tatt i lysmikroskop, forstørrelse 100x av Lisa Øvredal*



*Figur 3.4 – NVIO 10869 Vibrio ordalii-lignende dyrket på blod-agar 2% NaCl i 4 dager ved 22°C. Små, gjennomsiktige kolonier. Foto: Lisa Øvredal*

### 3.2 MALDI-TOF

MALDI-TOF ble utført to ganger på alle isolater. Ved første utførelse ble samtlige isolater identifisert som *Vibrio anguillarum*. Andre gang MALDI-TOF ble utført klarte instrumentet å skille *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Dette var etter den norske rognkjeks stammen (NVIO 9225) ble lagt inn som referansestamme i MALDI-TOF databasen. Under er det listet opp to tabeller (tab.3.2 og tab. 3.3) over identifikasjonen instrumentet gjorde av de seks isolatene det er gjort full fenotyping av. *Vibrio ordalii* isolatet (NVIO 4827) ble identifisert som *Vibrio anguillarum*.

Tabell 3.2 - Identifikasjon av 6 isolater det er gjort full fenotyping av, før *Vibrio ordalii* fra Norsk rognkjeks ble lagt inn i databasen til MALDI-TOF instrumentet

Sample ID	Organism (best match)	Score value	Organism (second-best match)	Score value
NVIO 4827	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.31	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.07
NVIO 9225	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.06	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.03
NVIO 10593	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.26	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.16
NVIO 8458	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.38	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.26
NVIO 9754	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.28	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.28
NVIO 10896	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.00	<i>Vibrio anguillarum</i>	1.94

Tabell 3.3 - Identifikasjon av 6 isolater det er gjort full fenotyping av, etter at *Vibrio ordalii* fra Norge ble lagt inn i databasen til MALDI-TOF instrumentet.

Sample ID	Organism (best match)	Score value	Organism (second-best match)	Score value
NVIO 4827	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.17	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.10
NVIO 9225	<i>Vibrio ordalii</i>	2.58	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.26
NVIO 10593	<i>Vibrio ordalii</i>	2.45	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.19
NVIO 8458	<i>Vibrio anguillarum</i>	1.81	<i>Vibrio anguillarum</i>	1.81
NVIO 9754	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.10	<i>Vibrio anguillarum</i>	2.10
NVIO 10896	<i>Vibrio ordalii</i>	2.46	<i>Vibrio anguillarum</i>	1.94

### 3.3 16S rRNA sekvensering for identifikasjon

Bekreftelse og identifikasjon av at alle isolater var *Vibrio*-arter ved 16S rRNA sekvensering. Ved sekvensering av dette genet var det vanskelig å skille mellom *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii*. Isolater som i utgangspunktet skulle være *Vibrio ordalii*, ble identifisert i BLAST som *Vibrio anguillarum*. Alle isolater med i denne oppgaven hadde nesten 100% identiske 16S rRNA-sekvenser.

### 3.4 MLSA

Sekvenser for åtte protein-kodende husholdningsgener, (*atpA*, *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *ropA* og *topA*) fra 31 *Vibrio ordalii*-lignende isolater, 7 *Vibrio ordalii* isolater og 18 *Vibrio anguillarum* isolater (inkludert sekvenser hentet fra Steinum et al., 2016) ble undersøkt i MLSA analysen (Fig.3.5). Separate fylogenetiske ML-trær for alle åtte husholdningsgener er lagt ved under vedlegg (Fig.5.2-5.5).

Den fylogenetiske analysen av sammensatte sekvenser viser at de 56 isolatene deles inn i tre store klynger. En klynge inneholder 7 isolater av *Vibrio ordalii* fra Stillehavsområdet, en klynge med 18 isolater av *Vibrio anguillarum* fra Norge og en klynge med 31 isolater av *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet.

*Vibrio ordalii* plasseres alene, separat fra *Vibrio anguillarum* klyngen. *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasserte seg også i en egen klynge, og representerer en tidligere gren av det fylogenetiske treet. *Vibrio ordalii* klyngen fra Stillehavsområdet deler seg inn i tre mindre grupper, hvor isolater fra USA isolert fra sølvflaks plasseres i en gruppe og isolater fra Chile isolert fra laks plasseres i to nære grupper. Dette støttes også av fenotypiske forskjeller.

*Vibrio anguillarum* isolater ser ut til å være mer heterogene enn *Vibrio ordalii* isolater. Stammene samler seg i grupper avhengig av om bakteriene er serotype O1 eller O2/O2a. Artstilhørighet ser ikke ut til å være tilfelle da isolater av samme genotyper fra ulike fiskearter plasseres mellom hverandre.

*Vibrio ordalii*-lignende isolater skiller seg morfologisk fra *Vibrio ordalii*-isolater. Analysen viser en betydelig avstand mellom disse to klyngene. *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasseres seg nærmere norske *Vibrio anguillarum* isolater fra rognkjeks enn *Vibrio ordalii* isolater.

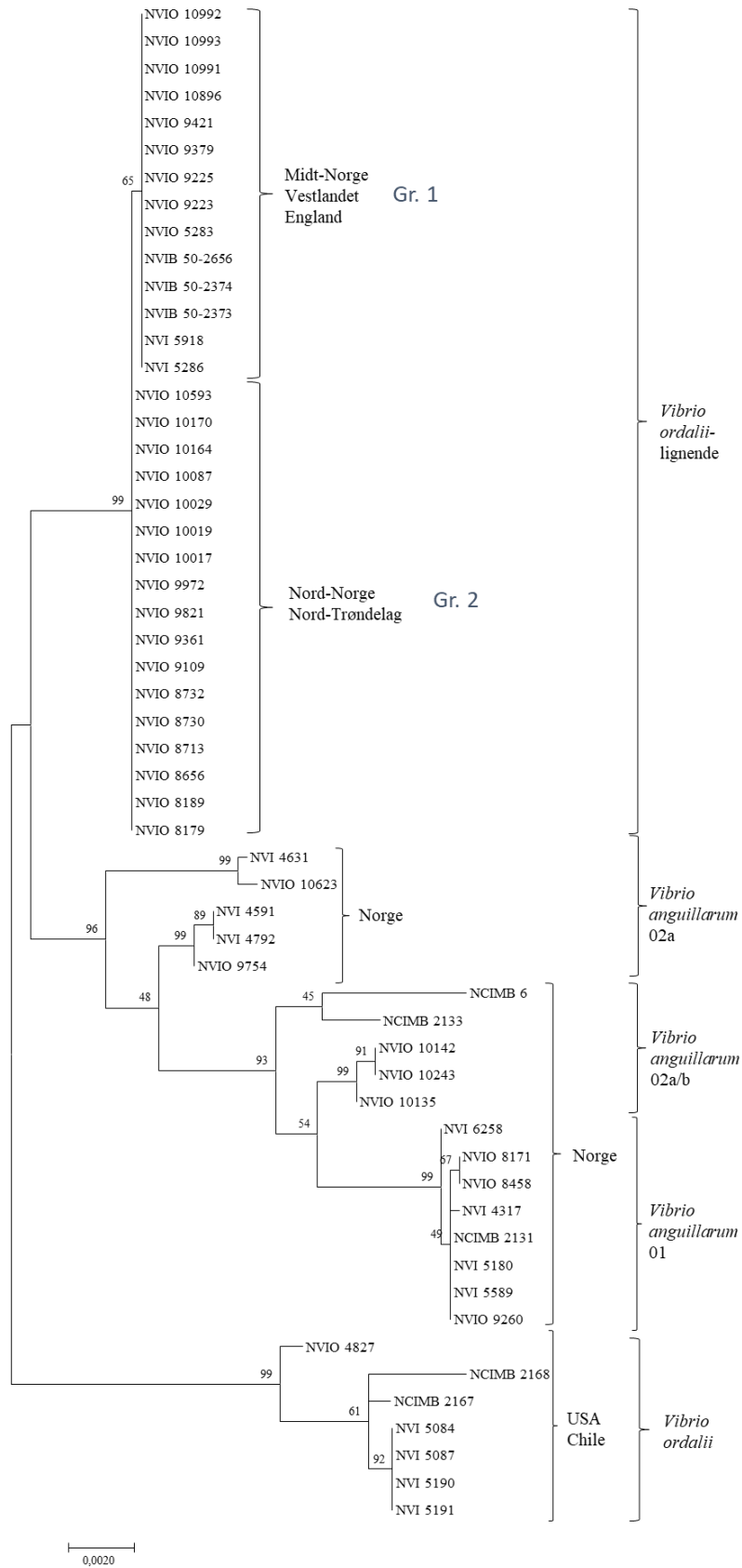
*Vibrio ordalii*-lignende isolater viser seg å være svært nært beslektede grupper av isolater som deles i to grupper (Gr.1 og Gr.2). Gruppene skilles av en enkelt basemutasjon i et av de åtte husholdningsgenene som ble sekvensert, *topA*.

Gruppe 1 inkluderer 14 isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Hovedsakelig isolert i 2015-2018, med et unntak.

Gruppe 2 består av 17 isolater hovedsakelig fra Nord-Norge, samt to isolater fra Nord-Trøndelag. Isolert fra 2011-2016.

Klyngen av *Vibrio ordalii*-lignende isolater kan relateres til både geografi og i stor grad etter kronologi (årstall). Det kan se ut som geografi er viktigere enn artstilhørighet, på bakgrunn av isolater fra torsk og hyse som plasseres mellom rognkjeks-isolater fra samme geografiske område.

Separate ML-analyser for hvert enkelt gen (Fig.5.2-5.5) har relativt lik topologi sammenlignet med det sammensatte gensekvens-treet (Fig.3.5). Alle separate gen-trær grupperer *Vibrio anguillarum* for seg, *Vibrio ordalii* isolater for seg og *Vibrio ordalii*-lignende isolater for seg. Et unntak er *pyrH* hvor noen *Vibrio anguillarum* isolater plasseres mellom *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Det er kun gensekvenser for *topA* som skiller *Vibrio ordalii*-lignende isolater i to nære grupper, resterende gen-trær plasser disse i en stor homogen gruppe. For *gapA*, *ftsZ* og *topA* plasseres *Vibrio ordalii* nærmere *Vibrio anguillarum*. *atpA*, *ftsZ*, og *ropA* skiller ikke *Vibrio anguillarum* i grupper etter serotyper. Dette avviker fra det sammensatte gensekvenstreet. Gensekvenslikheter mellom isolatene ligger på henholdsvis; 97,7% (*atpA*), 94,7% (*ftsZ*), 97,5% (*gapA*), 97,3% (*gyrB*), 96,4% (*mreB*), 97,0% (*pyrH*), 98,0% (*ropA*) og 96,7% (*topA*).



Figur 3.5 - Maximum Likelihood-tre basert på sammensatte gensekvenser av alle åtte loki (3891bp). Kimura 2 G+I valgt som beste substitusjonsmodell. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner, indikeres med verdier fra 45-99% over greiner. Treet med høyest log likelihood er vist. Skala 0,0020

### 3.5 MLST

Sekvenser for de samme åtte protein-kodende gener og samme 56 isolater ble undersøkt i MLST analysen som for MLSA. MLST er en klyngebasert analyse, som gir noe mindre detaljerte relasjoner mellom nært beslektede arter (figur 3.6). Likevel viser treet omtrent samme mønster som MLSA (figur 3.5).

MLST analysen viser 21 ulike sekvenstyper (ST), hvor ST 4 og ST 1 er de mest prevalente gruppene av *Vibrio ordalii*-lignende isolater.

ST1 inneholder 14 isolater fra rognkjeks, torsk og hyse, alle fra Vestlandet, England og Midt-Hordaland.

ST4 inneholder 14 rognkjeks isolater fra Nord-Norge og Nord-Trøndelag, i tillegg til ST7, ST8 og ST11 fra samme området som plasseres med én ulikhet i alleler fra ST4.

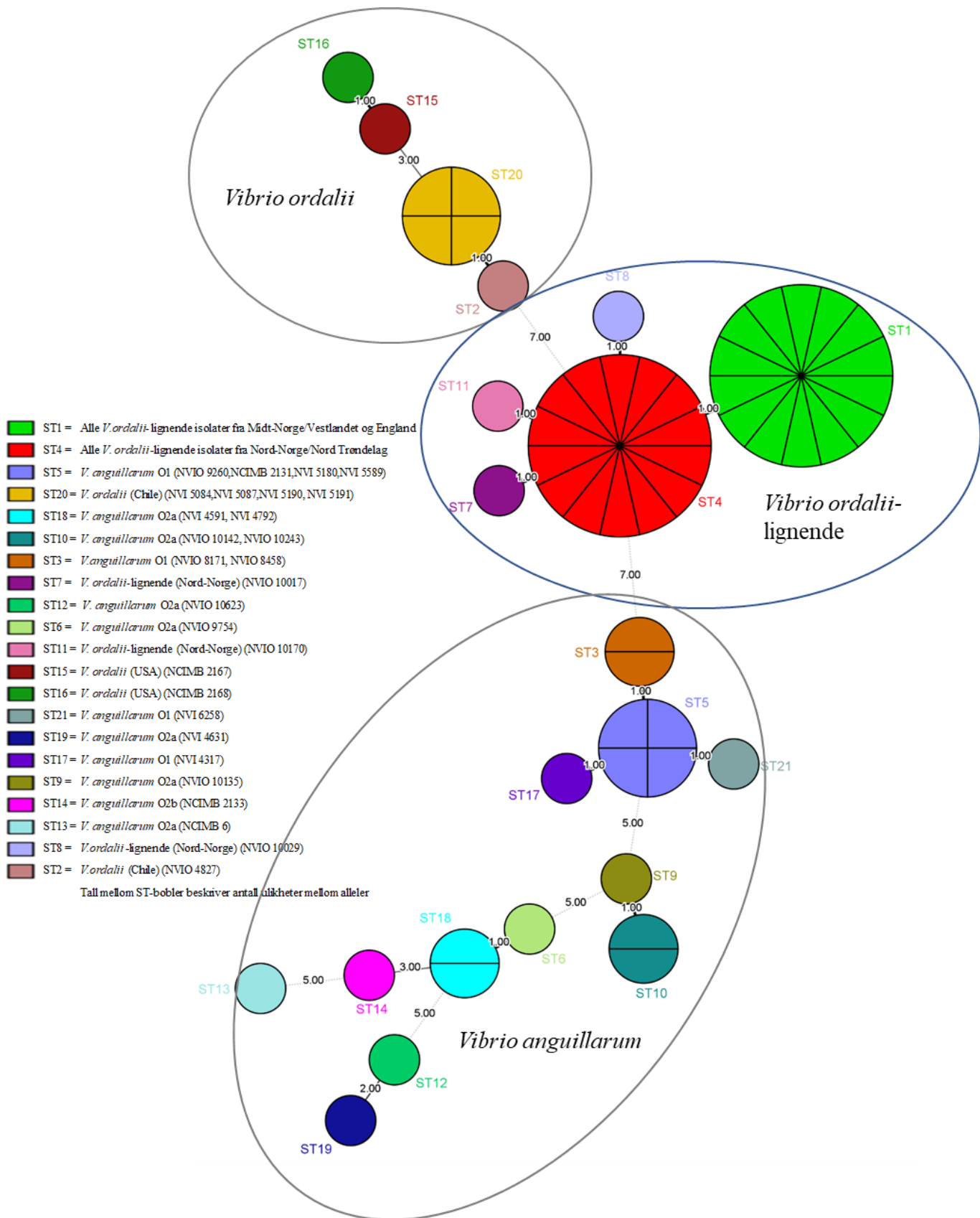
Avstand mellom *Vibrio ordalii*-lignende isolater (ST1/ST4/ST7/ST8/ST11) og *Vibrio ordalii* fra Chile (ST2/ST20) og USA (ST15/ST16) kan sees på samme måte som for MLSA. Det kan se ut som chilenske stammer plasserer seg noe nærmere *Vibrio ordalii*-lignende isolater enn *Vibrio ordalii* isolater fra USA gjør.

*Vibrio anguillarum* plasseres også i en egen klynge, og grupperes avhengig av serotype O1/O2a/O2b. Artstilhørighet ser ikke ut til å være tilfelle, på samme måte som for MLSA.

ST5, ST3, ST21 og ST17 består av *Vibrio anguillarum* O1 fra laks (ST21), rognkjeks (ST3) og regnbueørret (ST17). ST5 inneholder alle tre arter.

ST18, ST10, ST12, ST19, ST9, ST13, ST6 består av *Vibrio anguillarum* O2a fra laks, torsk og rognkjeks.

ST14 består av et isolat av *Vibrio anguillarum* O2b fra sei.



Figur 3.6 - Minimum Spanning basert tre konstruert i BioNumerics 7.6. Tall mellom ST-boblene beskriver antall ulikheter mellom alleler.

### 3.6 MLVA

Seks ulike VNTR- loki er brukt for MLVA analysen. Et utvalg av gel-bilder brukt for avgjørelse av VNTR-type er vist i figur 3.7-3.9. MLVA analysen (fig.3.10) viser en oversikt over 28 *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet (Nordland, Nord-Trøndelag, Troms, Midt-Hordaland, Hordaland, Rogaland, Møre og Romsdal og England). MLVA viser en høyere grad av resolusjon mellom de to nært beslektede gruppene av *Vibrio ordalii*-lignende isolatene enn MLSA og MLST kunne presentere. Isolatene deles inn i 11 ulike VNTR-typer basert på PCR-amplifikasjon og bedømmelse av DNA-fragmentene i agarose-gel.

MLVA-treet er forenlig med MLSA og MLST analysene, som viser at *Vibrio ordalii*-lignende isolater deles inn i to nære grupper. Analysen gir en høyere oppløsning enn MLSA/MLST av slektskap mellom de svært nære gruppene.

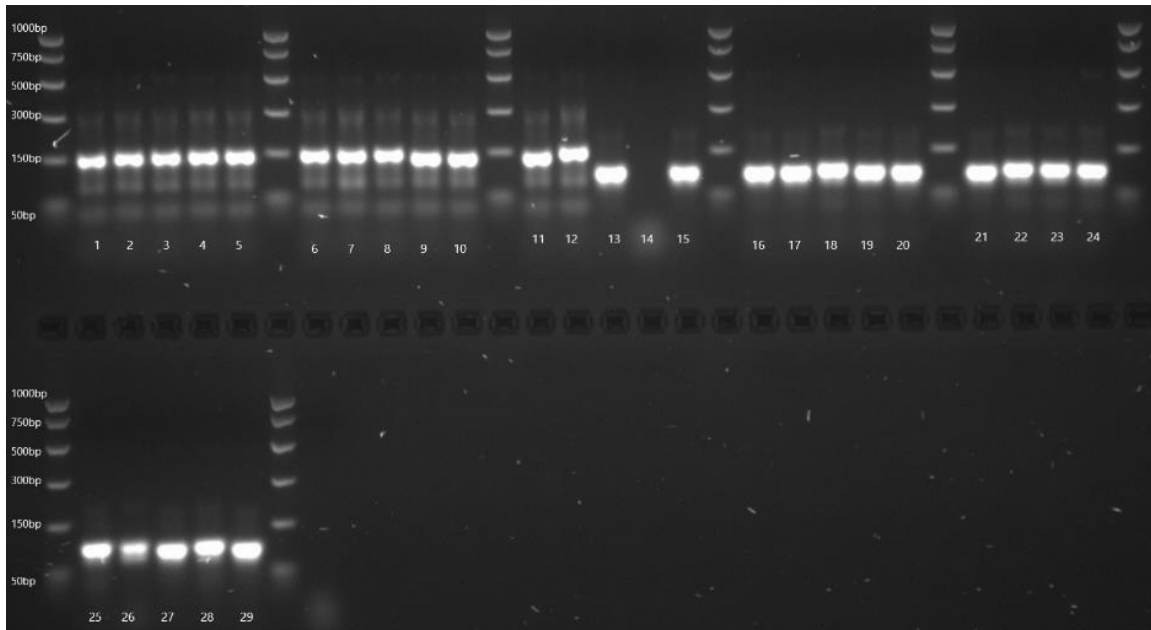
Videre indikerer MLVA resultatene at isolatene i hver gruppe fra MLSA er noe ulike. Nord-norske isolater samler seg nær hverandre, og deles inn i 4 ulike VNTR-typer (VNTR-type 8, 9, 10 og 11).

Isolatene fra Vestlandet, Midt-Norge og England plasseres også nærme hverandre, og forskjeller mellom isolatene sees også her. Denne gruppen deles inn i 7 ulike VNTR-typer (VNTR-type 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7). Isolatene fra England plasseres i egne VNTR-type 6 og 7. Dette kan indikere at denne gruppen er mer heterogen enn Nord-norske *Vibrio ordalii*-lignende isolater.

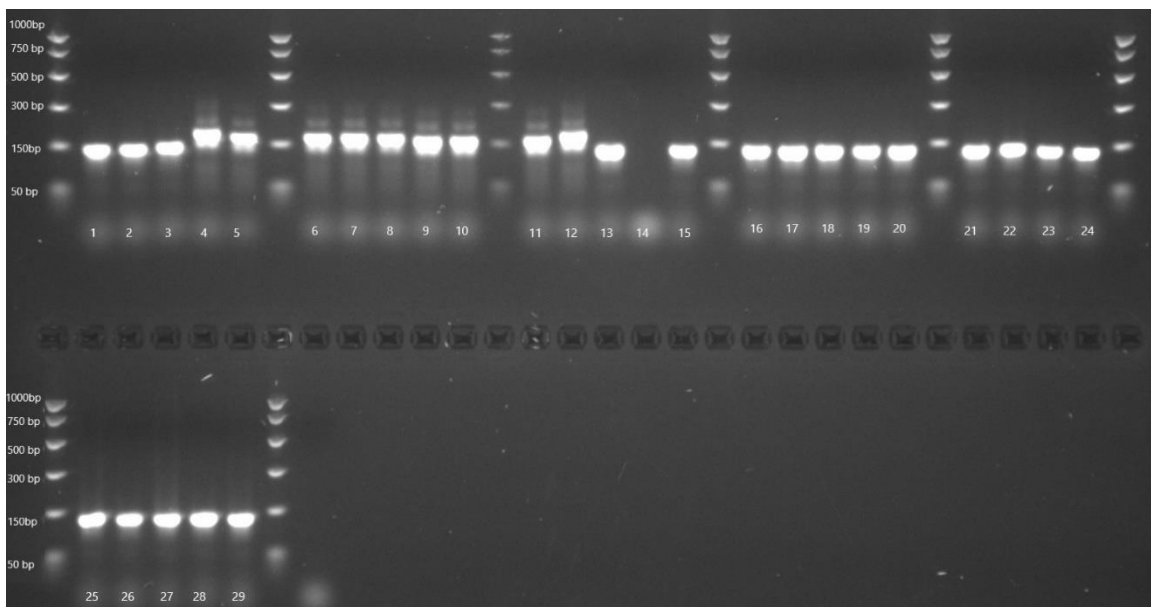
Et torskeisolat (NVIO 5283) og et hyseisolat (NVIO 9223) er inkludert. Torskeisolatet plasseres seg alene i VNTR-type 2, mens hyseisolatet plasseres sammen med rognkjeksisolater i VNTR-type 3. Dette kan imidlertid tyde på at det finnes små forskjeller mellom *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra ulike arter.



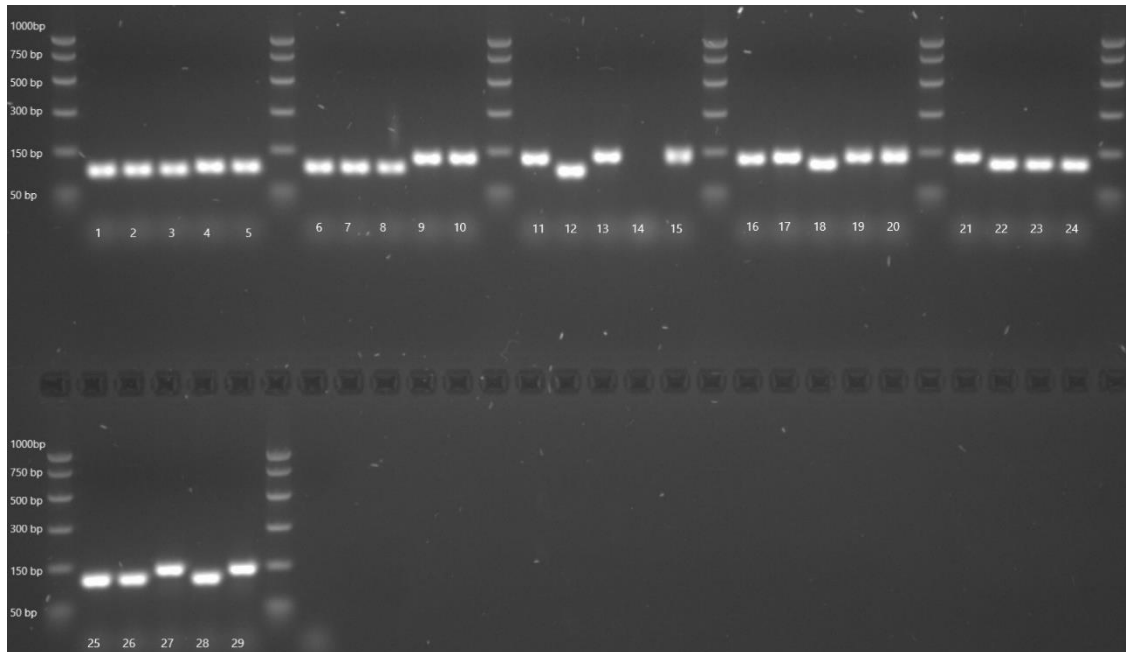
### 3.6.1 Resultater fra 2% Agarose gel-elektroforese



Figur 3.7 - VNTR 8. Nummereringen viser ulike isolater. Nr.1-12 er isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Nr.13-29 er isolater fra Nord-Norge og Trøndelag. Hver 5. brønn er markør (1000bp-50bp). 3 ulike størrelser på DNA-båndene (3VNTR-typer)



Figur 3.8 - VNTR 12. Nummereringen viser ulike isolater. Nr.1-12 er isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Nr.13-29 er isolater fra Nord-Norge og Trøndelag. Hver 5. brønn er markør (1000bp-50bp). 3 ulike størrelser på DNA-båndene (3VNTR-typer)



*Figur 3.9 - VNTR 6. Nummereringen viser ulike isolater. Nr.1-12 er isolater fra Midt-Norge, Vestlandet og England. Nr.13-29 er isolater fra Nord-Norge og Trøndelag. Hver 5. brønn er markør (1000bp-50bp). 3 ulike størrelser på DNA-båndene (3VNTR-typer)*

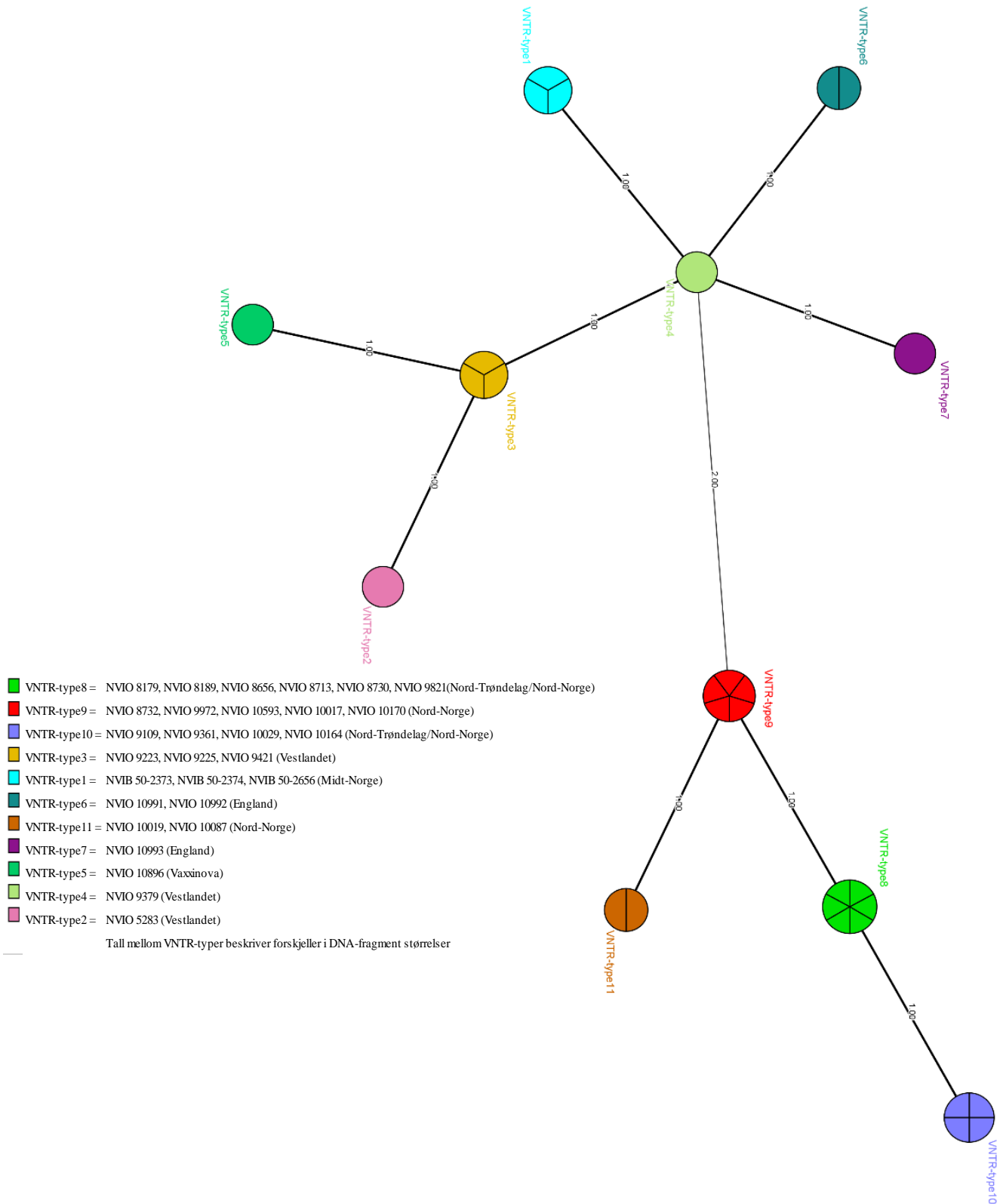
#### **Midt-Norge, Vestlandet og England;**

**1** = NVIB 50-2373, **2** = NVIB 50-2374, **3** = NVIB 50-2656, **4** = NVIO 5283, **5** = NVIO 9223, **6** = NVIO 9225, **7** = NVIO 9379, **8** = NVIO 9421, **9** = NVIO 10896, **10** = NVIO 10991, **11** = NVIO 10992, **12** = NVIO 10993

#### **Nord-Norge og Nord-Trøndelag;**

**13** = NVIO 8179, **15** = NVIO 8656, **16** = NVIO 8713, **17** = NVIO 8730, **18** = NVIO 8732, **19** = NVIO 9109, **20** = NVIO 9361, **21** = NVIO 9821, **22** = NVIO 9972, **23** = NVIO 10019, **24** = NVIO 10087, **25** = NVIO 10593, **26** = NVIO 10017, **27** = NVIO 10029, **28** = NVIO 10170, **29** = NVIO 10164

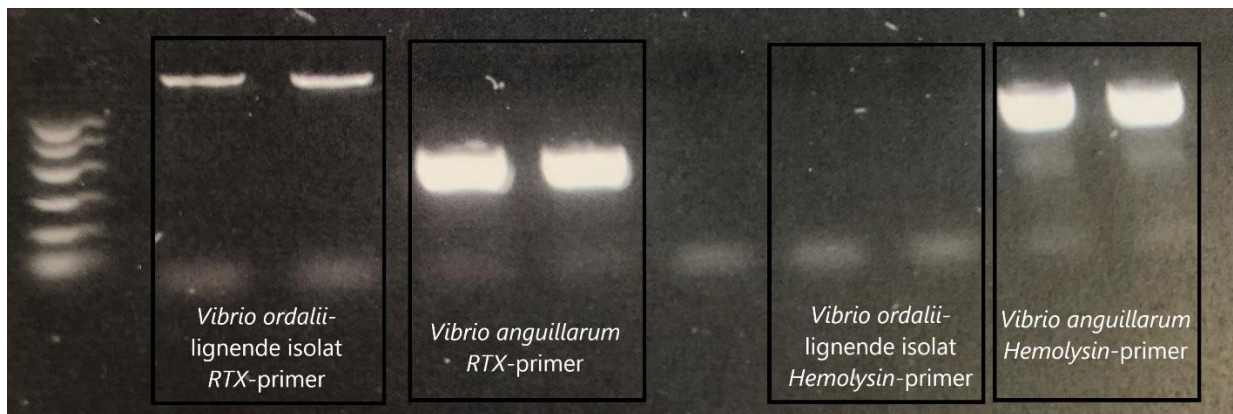
### 3.6.2 MLVA basert tre av *Vibrio ordalii*-lignende isolater



Figur 3.10 - Minimum Spanning Tree konstruert i BioNumerics 7.6 basert på MLVA av 28 isolater. Tall mellom VNTR-typer beskriver forskjeller i DNA-fragment størrelser. VNTR-type 1-7 = Midt-Norge, Vestlandet, England. VNTR-type 8-11 = Nord-Norge og Nord-Trøndelag

### 3.7 Virulens-gen analyse

Gel-bildet (fig.3.11) viser virulensgen primere (*RTX* og *hemolysin*). Hvor disse fungerer for *Vibrio anguillarum*, men ikke for *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Genene ble valgt på bakgrunn av tilstedeværelse i *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum*. Dette tyder på at *Vibrio ordalii*-lignende isolater og *Vibrio ordalii* isolater er relativt ulike, og kan ha ulike virulensgener.



Figur 3.11 - Gel-bildet av *RTX*-primere og *hemolysin* primere, testet på to *Vibrio ordalii*-lignende isolater og to *Vibrio anguillarum* isolater. Små bånd hos *Vibrio ordalii*-lignende isolater for *RTX* er trolig primer-rester.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Diskusjon av resultater

Hovedmålet med det utførte studiet var å beskrive populasjonsgenetikken mellom de svært nært beslektede artene *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater isolert fra hovedsakelig syk rognkjeks. Dette ble utført ved hjelp av molekylærbiologisk typing, samt fenotypiske tester. MLSA (fig.3.5) og MLST (fig.3.6) basert på sammensatte sekvenser av *atpA*, *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *topA* og *ropA* viser nært slektskap mellom artene, men likevel en betydelig avstand mellom *Vibrio ordalii* fra Stillehavsområdet og *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet. Analysene viser også at *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasseres i to nære grupper, basert på geografi. MLVA (fig.3.10) gav resultater forenlig med funnene fra MLSA/MLST om *Vibrio ordalii*-lignende isolater. MLVA ga videre en høyere oppløsning av slektskapsrelasjonen mellom isolatene i de to nære gruppene, og virker lovende som et mulig verktøy for fremtidig smittesporing av bakterien.

I dette masterprosjektet ble resultater av Steinum et al., (2016) bekreftet, om at *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* representerer genotypisk forskjellige varianter av svært nært beslektede bakterier (Steinum et al., 2016). Det ble også bekreftet at *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasserer seg genetisk nærmere *Vibrio anguillarum* enn *Vibrio ordalii*. Biokjemiske funn gjort i dette prosjektet støtter også at *Vibrio ordalii*-lignende isolater og *Vibrio ordalii* er morfologisk ulik, som beskrevet tidligere av Colquhoun et al. (2004).

Fenotypiske tester ble utført på seks isolater (mest morfologisk ulike), hvor det ble valgt ut tre isolater levert fra Veterinærinstituttet (VI) som *Vibrio anguillarum* og tre isolater levert fra VI som *Vibrio ordalii*/*Vibrio ordalii*-lignende (tab.3.1). Et av isolatene fra *Vibrio anguillarum* gruppen, NVIO 10896, avvike fra kriterier for klassifikasjon som *Vibrio anguillarum*. Dette var på bakgrunn av morfologiske egenskaper. Isolatet hadde små gjennomsiktige kolonier uten hemolyse, noe som er typisk for *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Lukt ble ikke registret og isolatet vokste sent (3-4 dager ved 22°C). Ved OF-test ble det observert svak gul-farge, noe som også ble observert for andre *Vibrio ordalii* isolater (klar gul for *Vibrio anguillarum*). Dette kan tyde på at NVIO 10896 er feil klassifisert. En slik antagelse kan ikke baseres kun på fenotypiske analyser, og må videre undersøkes og bekreftes ved genotypingsanalyser, noe som ble utført og bekreftet i denne studien. Naka et al., fant i 2011 at genomet til *Vibrio anguillarum* 775 er mye større enn genomet for *Vibrio ordalii* (NCIMB 2167), og dermed spekulert i om fysiske og økologiske forskjeller mellom disse to artene eksisterer (Naka et al., 2011). Genomet

for *Vibrio ordalii*-lignende isolater er ca.3,4 Mbp, som tilsvarer størrelsen til Stillehavs-isolater av *Vibrio ordalii* (pers. kom. Andreas Riborg). Observasjoner gjort i denne studien bekrefter grunnleggende forskjeller i biokjemiske prosesser mellom *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater.

NVIO 4827 isolert fra syk laks i Chile, levert av VI som *Vibrio ordalii*, samsvarte med andre *Vibrio ordalii*-lignende isolater på alle fenotypiske tester. Eneste unntak var kolonimorfologi, som er forenlig med tidligere studier gjort av Colquhoun et al., (2004). Det ble observert en klar hvit-farge på det chilenske isolatet i motsetning til *Vibrio ordalii*-lignende isolater som var fargeløs. Koloniene var også «klissete» og vanskelig å løse opp i PBS. Disse morfologiske egenskapene kan tyde på at *Vibrio ordalii* fra laks og *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra rognkjeks er ulike. Det ble observert treg vekst for begge typer *Vibrio ordalii* isolater under studiet, opp mot 4 dager ved 22°C. Studier gjort av Poblete-Morales et al., (2013) har spekulert i om bakterien har en mer optimalvekst ved 18°C.

For å videre identifisere alle isolatene ble det foretatt MALDI-TOF analyse. Alle isolater ble først identifisert som *Vibrio anguillarum*, dette indikerer at artene har en relativt nært beslektet genetisk oppbygging/protein mønster. Etter at referansestamme (NVIO 9225) for *Vibrio ordalii*-lignende isolat ble lagt inn i MALDI-TOF instrumentet var det forventet at NVIO 9225, NVIO 10593 og NVIO 10896 skulle identifiseres som *Vibrio ordalii*. Dette er på grunnlag av deres fenotypiske trekk. Stammene er isolert fra rognkjeks i Norge, og ble identifisert som forventet. NVIO 4827 isolert fra laks i Chile ble identifisert som *Vibrio anguillarum*, noe som viser at dette isolatet er såpass ulik *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra rognkjeks, at instrumentet ikke kjenner igjen dette som *Vibrio ordalii*. Dette støtter Steinum et al., (2016) sine funn om betydelig genetiske forskjeller mellom *Vibrio ordalii*-lignende isolater og *Vibrio ordalii*. NVIO 8458 og NVIO 9754 var forventet å identifiseres som *Vibrio anguillarum* på grunnlag av deres fenotypiske trekk, noe disse også ble. Alle har en «score value» på over 2 noe som betyr at identifikasjonen er relativt god og sikker. MALDI-TOF er en enkel og rask metode for identifisering av bakterier, men likevel forutsetter dette at instrumentet inneholder data for akkurat den bakterien som skal detekteres. Ved identifikasjon av ukjent bakterie som ikke finnes i databasen til MALDI-TOF, vil ikke instrumentet gjenkjenne identifikasjonen og kan identifisere feil bakterie, sannsynligvis en svært lik/nært beslektet bakterie, noe som var tilfelle i denne studien. Resultatene fra MALDI-TOF samsvarte med resultater fra fenotypings-tester.

Videre for å få en oversikt over slektskap mellom isolatene, ble genetikken til organismene studert ved hjelp av molekylærbiologisk typing. Gjennom alle steg i genotypingsmetodene, fra prosessering av rådata til fylogenetiske fremstillinger er det flere elementer som kan være med å påvirke sluttresultatet. Metoder kan velges, parametere kan settes og vurderinger kan tas i alle trinn.

MLSA og MLST tar for seg svært konserverte gener som koder for produkter helt essensielle for cellefunksjon. Studien representerer en sekvensanalyse av 31 *Vibrio ordalii*-lignende isolater, 7 *Vibrio ordalii* og 18 *Vibrio anguillarum* isolater, hovedsakelig fra rognkjeks i Nord-Atlanterhavsområdet, men også andre arter og områder. Konstruksjon av fylogenetisk slektskap for MLSA (fig.3.5) er basert på en sammensetning av de utvalgte gensekvensene for *atpA*, *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *ropA* og *topA*. Separate ML-trær for hver av de åtte gene (vedlegg, Fig. 5.2-5.5) viser hovedsakelig samme topologi som for det sammensatte gensekvens-treet. De relativt små forskjellene som er tilstede viser at horisontal genoverføring sannsynligvis ikke er tilfelle. Siden det er brukt flere gener i analysen gir dette en «buffer» for små forskjeller mellom de separate gen-trærne. MLSA-basert DNA-likheter for hver av de åtte gensekvensene for alle isolater var mellom 96,2% og 98,0%, som er innenfor forslaget fra Sawabe et al. (2007) om at *Vibrio* arter kan defineres som en gruppe isolater som deler mer enn 95% gensekvenslikheter av de åtte protein-kodende husholdningsgener. Eneste unntak var *ftsZ*-genet med 94,7% DNA-likhet. Steinum et al., (2016) kalkulerte DDH verdien mellom *Vibrio anguillarum* 775 og *Vibrio ordalii* NCIMB 2167 til 65,4 +/- 2,9%, som definerer disse to som separate arter (DDH verdi > 70%). NCIMB 2167 er isolert fra Stillehavsområdet. Publikasjonen påpeker også nødvendighet for mer undersøkelse av *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra Nord-Atlanterhavsområdet. Studien konkluderer med at isolater av *Vibrio ordalii* fra de to geografiske områdene er svært genetisk ulik, og at *Vibrio ordalii* fra Stillehavet var såpass ulik *Vibrio anguillarum* at de bør holdes som separate arter (Steinum et al., 2016). MLSA resultatene fra denne oppgaven bekrefter disse funnene, i tillegg til betydelig avstand mellom *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Og at sist nevnte isolater plasseres genetisk nærmere *Vibrio anguillarum*, som også ble funnet av Steinum et al., (2016). Resultatene støttes også av biokjemiske funn gjort underveis i oppgaven. *Vibrio ordalii*-lignende isolater viste ulik morfologi sammenlignet med *Vibrio ordalii* isolatet NVIO 4827.

*Vibrio ordalii*-lignende isolater fra torsk (NVIO 5283, NVI 5286, NVI 5918) og hyse (NVIO 9223) plasseres sammen med rognkjeks isolater fra både Norge og England. Dette kan tyde på

at *Vibrio ordalii*-lignende isolater ikke er spesielt artsspesifikke. Likevel er bakterien aldri funnet i salmonider, noe som kan tyde på et begrenset vertsspekter. Den kliniske situasjonen og prevalens blant rognkjeks kan likevel indikere at denne fisken er mer utsatt for *Vibrio ordalii*-lignende infeksjoner enn andre fiskearter. Det er også relativt jevnt fordelt av isolater hentet fra syk fisk i settefiskfasen og etter utsett i sjø, slik at i hvilken fase prevalensen er høyest for rognkjeks er usikkert. At *Vibrio ordalii*-lignende isolater kan være primærpatogen for rognkjeks kan ikke utelukkes.

MLSA analysen gir også vaksineprodusenter en god innsikt i heterogenitet mellom stammene, som kan legges til grunn for vaksineutvikling for denne *Vibrio ordalii*-lignende bakterien. De to nære gruppene er svært like, og skilles kun av en basemutasjon i *topA*-genet. Det kan derfor trolig utvikles en felles vaksine for disse to gruppene av isolater. Immunologiske aspekter må imidlertid undersøkes nærmere. Fra Stillehavsområdet er det kjent at vaksinasjon mot *Vibrio anguillarum* O2 gir en viss kryss-beskyttelse mot *Vibrio ordalii* fra samme område (pers. kom. Duncan Colquhoun). Men for å få en fullstendig beskyttelse bør det sannsynligvis utvikles separate eller flerkomponents vaksiner for bakteriene.

*Vibrio anguillarum* er mer heterogene enn *Vibrio ordalii*, og grupperer seg etter serotype (O1/O2/O2a/O2b). *Vibrio anguillarum* O2 er ofte isolert som en del av blandingsflora, og ikke nødvendigvis fra all fisk undersøkt (pers. kom. Duncan Colquhoun). Isolater fra ulike arter som laks, regnbueørret, torsk og rognkjeks er spredd i alle grupperingene. *Vibrio anguillarum* er en opportunistisk fiske-bakterie, og er ikke spesielt artsspesifikk (Martínez-Picado et al., 1996). Et unntak er *Vibrio anguillarum* O2b, som er relativt spesifikk for torskefisk. *Vibrio anguillarum* fremstår fra MLSA mer som en «miljøbakterie» enn *Vibrio ordalii*. Dette kan begrunnes med den høye graden av likhet mellom *Vibrio ordalii* isolater som kan tyde på at disse er tilpasset en nisje som patogen. *Vibrio anguillarum* med en større diversitet kan tyde på bedre evne til å adaptere mange forskjellige nisjer, som blant annet det å overleve i miljøet.

*Vibrio ordalii*-lignende bakterier er aldri isolert fra norsk laks, noe som kan tyde på at denne fisken ikke er spesielt mottakelig. Men om det oppstår alvorlige utbrudd hos rognkjeks i en laksemerd, kan det aldri utelukkes en smitteoverføring. Dette er spesielt viktig å få oversikt over i oppdrettssituasjoner hvor eksempelvis rognkjeks blir innført i laksemerder eller ved interaksjoner med villfisk. Det blir ikke undersøkt aktivt etter *Vibrio ordalii* i det akvatiske miljøet, og det er begrenset informasjon om tilstedeværelse her, men bakterien er ikke tidligere funnet andre steder enn i fisk. Ruiz et al. (2016) demonstrerte at bakterien kan overleve flere år



i sterilt sjøvann, men reduseres fort i ikke-sterilt sjøvann. Naka et al. (2011) beskriver en mulighet for overlevelse i det akvatiske miljøet ved biofilm-dannelse.

MLST gir i denne studien det samme store bildet som MLSA når det gjelder slektskap mellom ulike klynger av *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum*. Selv om metodene bruker samme molekylære markører (lokus) i genomet for analyse, gir MLSA en høyere fylogenetisk oppløsning enn MLST. MLST ansees som en klyngeanalyse på bakgrunn av forskjeller mellom ulike alleler, mens MLSA benytter parvise genetiske likheter og avstandsmetode for å beskrive slektskap (Maiden et al., 1998, Richter et al., 2006). Oppløsningsevne kan sees av de to fylogenetiske trærne for MLSA (fig. 3.5) og MLST (fig. 3.6), hvor MLSA-treet gir en mer nøyaktig fremstilling av slektskapsrelasjonene. Begge analysene viser likevel at *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasserer seg i to klynger relativt langt unna *Vibrio ordalii* og fra referansestammene NCIMB 2168/2167. Dette kan videre bety at *Vibrio ordalii*-lignende isolater kan representere en helt ny enda ubeskrevet bakteriell art/sub-art. Fremtidige studier bør undersøke dette nærmere.

På bakgrunn av homogenitet mellom *Vibrio ordalii*-lignende isolater vist i MLSA/MLST ble det utført en MLVA. MLVA er en «fingerprint» metode, og klassifiseres som en mer primitiv molekylærbiologisk typingsmetode. Den fungerer godt til å skille svært nært beslektede arter eller sub-arter, og har i noen tilfeller vist tilnærmet resolusjons-sensitivitet som HGS ved smittesporing. I denne oppgaven ble det brukt seks forskjellige VNTR-loki, for å konstruere MLVA-treet. Opprinnelig ble det testet 16 VNTR-primersett, hvor det ikke var variasjon i DNA-fragmentene i agarose-gel hos 12 av primerne. Derfor ble 10 primere utelatt i studiet. Det var forskjeller mellom fragmentene i fire av de seks inkluderte VNTR-lokiene. Analysen inkluderer kun *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Fokuset på disse isolatene var på bakgrunn av funnene i MLSA og MLST, i tillegg til primernes spesifisitet. Funnene gjort ved MLSA/MLST gjorde det interessant å få en høyere oppløsning av slektskap mellom de to svært nære gruppene av isolater. Det er ikke gjort noen tidligere publiserte studier hvor det er utført MLVA av *Vibrio ordalii*-lignende eller *Vibrio ordalii* isolater fra noen deler av verden. Funnene gjort i MLVA er forenlig med MLSA/MLST, som viser to nære grupper av isolater. Videre viser analysen at de to nære gruppene av *Vibrio ordalii*-lignende isolater deles inn i 11 ulike VNTR-typer, noe som godt illustrerer mulighetene for å benytte MLVA i evt. smittesporing. Nord-norske isolater grupperes i 4 ulike VNTR-typer, mens isolater fra Vestlandet, Midt-Norge og England grupperes i 7 ulike VNTR-typer. Dette kan tyde på at den Nord-norske gruppen er en mer

homogen gruppe. Likevel inneholder denne gruppen kun rognkjeks isolater, noe som kan forklare dette. Ganske interessant er at i gruppen fra Vestlandet, Midt-Norge og England grupperer rognkjeks isolater fra Norge seg sammen, mens isolater fra England grupperes sammen (VNTR-type 6 og 7). Dette gjelder også for torske-isolatet som plasseres i en egen gruppe (VNTR-type 2). Dette kan imidlertid tyde på at *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra andre deler av Europa enn Norge, kan være noe ulike. Og at ulike subarts-typer mulig kan være mer artsspesifikk enn antatt. Videre studier bør undersøke dette nærmere, hvor flere isolater og VNTR loki inkluderes.

Det ble også forsøkt å utføre en virulensgen-analyse av isolatene for å skille *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra hverandre. Virulensgener er ofte under positiv seleksjon, og kan dermed gi relativt høy resolusjon mellom sub-arter. Det ble designet primere for både *RTX*-genet (repeats-in-toxin) og *hemolysin*-genet, som i utgangspunktet skulle være tilstede i *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum*, ifølge studier gjort av Naka et al. (2011). Tilstedeværelse av genene ble undersøkt i tilgjengelige helgenomsekvenser fra genbank (NCIB). Hvor det kun var helgenomsekvenser tilgjengelig for chilensk *Vibrio ordalii* og i tillegg svært få tilgjengelige homologe sekvenser for disse virulensgenene, utenom referansestamme-sekvensene. Dermed lite utvalg for sammenligning av sekvenser, for å finne passende plass for primer-design. Primerne som ble designet viste seg å kun passe til *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii*, ikke for de *Vibrio ordalii*-lignende isolatene. Sekvenser av *Vibrio ordalii* tilgjengelig i genbank (NCBI) må dermed være relativt ulik *Vibrio ordalii*-lignende isolater. Det kan også tyde på at det er en del forveksling av *Vibrio ordalii* og *Vibrio anguillarum* i sekvenser som ligger på nett. På grunn av virulensprimere som ikke fungerte for *Vibrio ordalii*-lignende isolater, kan dette tyde på manglende gener eller manglede/forskjellige primersekvenser hos disse isolatene enn for *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii*, noe som ble bekreftet senere. Etter mislykkede forsøk med virulens-primere ble det foretatt en helgenomsekvensering av flere norske *Vibrio ordalii*-lignende isolater utført av Andreas Riborg ved Veterinærinstituttet i Oslo, (2019). Det viste seg at *hemolysin*-genet og *RTX*-genet ikke er tilstede i disse isolatene. Undersøkelsene som ble gjort av Naka et al. (2011) av *Vibrio ordalii* var isolert fra sølvflaks i Stillehavet, hvor begge virulensgenene ble funnet. Dette bekrefter også de store ulikhetene mellom *Vibrio ordalii*-lignende isolater og *Vibrio ordalii* som er funnet i publikasjonen fra Steinum et al. (2016) og i denne studien.



av prosessering av store data og dermed behov for personell med høy kompetanse for analyse enn MLSA/MLST, ble sistnevnte valgt å bruke i denne oppgaven. MLSA er en svært god, rask og pålitelig molekylærbiologisk typingsmetode og har en fordel sammenlignet med for eksempel PFGE og HGS ved at den gir en samlet, nøyaktig data som enkelt kan identifiseres gjennom databaser på nettet og sammenlignes med sekvenser fra ukjente organismer, relativt fort. Metoden har et stort potensial for avgrensning og identifikasjon av arter, samt studier av bakterielle forhold på et bredt spekter av evolusjonære relasjoner. MLST er velfungerende dersom en skal skissere evolusjonært slektskap, men fungerer ikke for dypere fylogenetiske undersøkelser. Dette er på bakgrunn av at graden av variasjoner i sekvensene ignoreres. MLST er derfor ofte brukt til, eksempelvis, epidemiologisk smittesporing av isolater som hører til en godt definert art, mens MLSA fungerer bedre når det skal undersøkes taxa med mindre definerte artsgrenser.

Et kritisk punkt for MLSA og MLST er valg av gener for analyse. Husholdningsgener bør velges på bakgrunn av deres stabilitet. Et universelt sett av gener som fremmer hierarkisk klassifikasjon av alle prokaryoter må settes sammen for de best egnede genene til å skille nært relaterte taxa. Derfor blir ofte gener valgt uavhengig av taxa som skal undersøkes, for best mulig optimalisering i forhold til den aktuelle familien/slekten/arten. Metodene tar for seg flere markører i genomet det kun finnes en kopi av, i tillegg til en dN/dS-ratio  $< 1$  (Viscidi and Demma, 2003). Det er anbefalt å undersøke minimum to husholdningsgener for identifikasjon av bakterier, og flere gener for fylogenetiske analyser (Martens et al., 2008). I denne oppgaven ble det valgt å bruke åtte husholdningsgener, for best mulig global og pålitelig oversikt over relasjoner mellom de ulike *Vibrio* isolatene. Dette støttes også av tidligere studier gjort av andre bakterier, hvor det er vist at flere gener gir mer pålitelig fylogenetisk fremstilling (Devulder et al., 2005).

Ved utførelse av MLVA analyse må det gjøres andre analyser først. For eksempel MLSA eller MLST, for å avdekke det store bildet når det gjelder slektskap. MLVA kan da videre gi en oversikt over de artene/subartene som trengs høyere oppløsning av, hvor MLSA og MLST ikke strekker til. Når DNA-fragmentenes lengde leses av i agarose-gelen, kan avlesning være noe subjektivt, som kan gi forskjeller i antall VNTR-typer. Det bør derfor gjøres kapillær elektroforese og sekvensering av PCR-produkter for sikrere resultat. Dette ble ikke utført i denne studien på grunn av tids- og finansieringsbegrensning. MLVA beregningen utført i denne oppgaven er en indikasjon på hvordan de norske *Vibrio ordalii*-lignende isolatene plasserer seg

i forhold til hverandre. MLVA er ikke spesielt arbeid- eller tidkrevende, og kan fullføres relativt raskt etter isolering av bakterien. Den er heller ikke spesielt kostbar i forhold til HGS. Metoden gir også en høy oppløsning når svært genetisk like isolater skal skilles, i forhold til oppløsningsnivået MLSA og MLST har på et så lavt taksonomisk nivå.

Hadde dette prosjektet hatt mer tid til disposisjon kunne helgenomsekvensering blitt utført av alle isolater, flere VNTR-loki kunne vært undersøkt og utførelse av kapillær elektroforese for MLVA. Det kunne også med fordel ha vært inkludert flere isolater av *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra rognkjeks, men også fra andre arter.

## 5 Konklusjon

Populasjonsgenetikken for *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* isolert fra Stillehavsområdet og *Vibrio ordalii*-lignende isolater isolert fra Nord-Atlanterhavsområdet ble kartlagt nærmere i denne studien. Dette er første studiet gjort i stor skala på *Vibrio ordalii*-lignende isolater på verdensbasis. Det er også utviklet en MLVA, som med litt mer raffinering, kan være et godt smittesporingsredskap for bakterien. Denne studien viser at *Vibrio ordalii* og *Vibrio ordalii*-lignende isolater er relativt genetisk ulike. *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasseres nærmere *Vibrio anguillarum* enn *Vibrio ordalii*. Dette kan dermed indikere at *Vibrio ordalii*-lignende isolater sannsynligvis bør beskrives som en egen sub-art av *Vibrio anguillarum*, eller som en selvstendig art/sub-art basert på fenotypiske og økologiske forskjeller. Dette bør undersøkes nærmere i videre studier. MLSA og MLST analysene viser videre at *Vibrio ordalii*-lignende isolater plasseres i to svært nære grupper basert på geografi. MLVA var forenlig med dette og ga en enda høyere oppløsning mellom isolatene. Analysen delte dem inn i 11 ulike VNTR-typer som viser at det finnes forskjeller innad i de to nære gruppene av *Vibrio ordalii*-lignende isolater. MLVA resultatene kan tyde på at *Vibrio ordalii*-lignende isolater fra andre deler av Europa enn Norge, kan være noe ulike. Og at ulike subarts-typer mulig kan være mer artsspesifikk enn antatt. Videre studier bør undersøke dette nærmere, hvor flere isolater og VNTR-loki inkluderes. Resultatene kan gjøre det enklere for smittesporing av bakterien og for utvikling av effektive vaksiner.

# Kilder og litteratur

- Aaen, S.M., Helgesen, K.O., Bakke, M.J., Kaur, K., Horsberg, T.E., 2015. Drug resistance in sea lice: A threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol.* 31, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Abd-elsalam, K.A., 2003. Minireview Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design 2, 91–95.
- Akayli, T., Timur, G., Albayrak, G., Aydemir, B., 2010. The Open Access Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh Editor-in-Chief Copy Editor.
- Amann, R.I., Lin, C., Key, R., Montgomery, L., Stahl, D.A., 1992. Diversity Among Fibrobacter Isolates : Towards a Phylogenetic Classification. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 23–31. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80133-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80133-5)
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. Characteristics of the pathogens: Gram-negative bacteria.
- Balboa, S., Ferguson, H.W., Romalde, J.L., 2007. Phenotypic , serological and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from cod , *Gadus morhua* L . , in northern Europe 657–664.
- Bean, P., Methods, M.T., 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661–1669.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acid Res.* 27, No.2, 573–580.
- Bichara, M., Wagner, J., Lambert, I.B., 2006. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 598, 144–163. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.01.020>
- BioNumerics 7.6, 2019. Bionumerics version 7.6: new features june 2016 copyright by applied maths nv. <http://www.applied-maths.com/bionumerics>
- Blazer, V.S., 1988. Bacterial fish pathogens, *Environmental Biology of Fishes*. <https://doi.org/10.1007/BF02984445>
- Bornø, G., Colquhoun, D., Alarcon, M., Nilsen, H., Ml, L., Gu, J., Gjerset, B., Hansen, H., Thoen, E., Gulla, S., Veterinærin, J.B.B., 2016. Veterinærinstituttets rapportserie Akutt dødelighet hos rognkjeks ( *Cyclopterus lumpus* ) i 2015 Geir Bornø Maria Lie Linaker Jinni Gu.
- Brooker, A.J., Papadopoulou, A., Gutiérrez, C., Rey, S., Davie, A., Migaud, H., 2018. Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges 44.
- Bruker Daltonics Inc., 2014. MALDI Biotyper CA System. [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/Separations\\_MassSpectrometry/Literature/Brochures/MALDI-biotyper-CA-Brochure\\_08-2014\\_ebook.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/MALDI-biotyper-CA-Brochure_08-2014_ebook.pdf)
- Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306, 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- Butte, A.J., Dzau, V.J., Glueck, S.B., 2001. Further defining housekeeping, or “maintenance,” genes Focus on “A compendium of gene expression in normal human tissues” 95–96.
- Bykadorov, I.A., 2017. Monopolistic competition model with different technological innovation and consumer utility levels. *CEUR Workshop Proc.* 1987, 108–114. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4>
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P. V., Jackson, R.B., 2015. *Biology: A Global Approach* 10, 326,629-640.
- Chor, B., Tuller, T., 2005. Maximum likelihood of evolutionary trees: Hardness and approximation. *Bioinformatics* 21, 97–106. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1027>
- Colquhoun, D.J., Aase, I.L., Wallace, C., Baklien, Å., Gravningen, K., 2004. First description of *Vibrio ordalii* from Chile 24, 185–188.

- Colquhoun, D.J., Lillehaug, A., 2014. Vaccination against vibriosis 4, 16–17.
- Dasmeh, P., Serohijos, A.W.R., Kepp, K.P., Shakhnovich, E.I., 2014. The influence of selection for protein stability on dN/dS estimations. *Genome Biol. Evol.* 6, 2956–2967. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu223>
- Davenport, J., 1985. Synopsis of biological data on the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* (Linnaeus, 1758). *Agric. Organ. United Nations* (147):31 p.
- Davenport, J., Kjørsvik, E., 1986. Buoyancy in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus*. *J. mar. biol. Ass. U.K* 66, 159–174.
- Delidow, B.C., John, P.L., Peluso, J.J., White, B.A., 1993. *Polymerase Chain Reaction* 15.
- Devulder, G., de Montclos, M.P., Flandrois, J.P., 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 293–302. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63222-0>
- Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D.J., Peto, T.E.A., Crook, D.W., 2012. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat. Publ. Gr.* 13, 601–612. <https://doi.org/10.1038/nrg3226>
- Donelli, G., Vuotto, C., Mastromarino, P., 2013. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* 24, 1–8. <https://doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20105>
- Drouin, D.B.R., 1907. Les maladies des poissons d'eau douce d'Europe *Annales de Sciences Agronomique* 1:120-250.
- Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A., Hjeltnes, B., 1986. *Vibrio salmonicida* s p . nov ., a New Fish Pathogen 36, 518–520.
- Ellington, M.J., Ekelund, O., Aarestrup, F.M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M.T.G., Hopkins, K.L., Iredell, J., Kahlmeter, G., 2017. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria : report from the EUCAST Subcommittee 23, 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>
- Eyre, D.W., Fawley, W.N., Best, E.L., Griffiths, D., Stoesser, N.E., Crook, D.W., Peto, T.E.A., Walker, A.S., Wilcox, M.H., 2013. Comparison of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for investigation of *Clostridium difficile* transmission. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4141–4149. <https://doi.org/10.1128/JCM.01095-13>
- Farmer, J., Frances, B.W., Cameron, D.N., Birkhead, K.M., Janda, J.M., 2015. *Vibrio*. *Bergey's Man. Syst. Archaea Bact.* 1–79. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01078>.
- Fiskeridirektoratet, 2019. Rensefisk. <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk>.
- Fiskeridirektoratet, 2018. Statistikk for akvakultur 2017. <http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/statistiske-Publ>.
- Geneious® 11.1.5, 2018. Software. Biomatters Dev. team [www.geneious.com](http://www.geneious.com).
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Peer, Y. Van De, Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J., 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Focus Horiz. gene Transf.* 3, 733–739.
- Glaeser, S.P., Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
- Goulet, D., Green, J.M., Shears, T.H., 1986. Courtship, Spawning, And Parental Care Behavior Of The Lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., In Newfoundland. *Can. J. Zool.* 64, 1320–1325. <https://doi.org/10.1139/z86-196>
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Gulla, S., 2015. Introductory studies on bacterial agents infecting cleaner fish. *Philos. Dr. Thesis* 15–40.

- Gulla, S., Barnes, A.C., Welch, T.J., Romalde, J.L., Ryder, D., Ormsby, M.J., Carson, J., Lagesen, K., Verner-jeffreys, D.W., Davies, R.L., Colquhoun, J., 2018. Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of *Yersinia ruckeri* Confirms the Existence of Host Specificity, Geographic Endemism, and Anthropogenic Dissemination of Virulent Clones *Snorre* 84, 1–13.
- Gulla, S., Lund, V., Kristoffersen, A.B., Sørum, H., Colquhoun, D.J., 2016. *vapA* ( A-layer ) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes 329–342. <https://doi.org/10.1111/jfd.12367>
- Gut, I.G., 2004. DNA Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Hum. Mutat.* 23, 437–441. <https://doi.org/10.1002/humu.20023>
- Haugland, G.T., Rønneseth, A., Wergeland, H.I., 2018. Cleaner fish biology and aquaculture applications. *Immunol. vaccinologu lumpfish wrasse* Chapter 14, 258–273.
- Hendrie, M.S., Hodgkiss, W., Shewan, M., 1971. Proposal That the Species *Vibrio anguillarum* Hodgkiss 1960 Be Combined as a Single Species , *Vibrio anguillarum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21, 64–68.
- Hjeltnes B, Bang-Jensen B, Bornø G, Haukaas A, W.C.S. (red), 2018. Fiskehelse rapporten. Veterinærinstituttet 2018 108.
- Hjeltnes, B., Jensen Bang, B., Bornø, G., Haukaas, A., Walde S, C., 2019. Fiskehelse rapporten. Fisk. 2018.
- Huelsenbeck, J.P., Hillis, D.M., 1993. Success of phylogenetic methods in the four taxon case. *Syst. Biol.* 42, 247–264. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.3.247>
- Institute of Marine Research, 2016. Havforskningsrapporten 2016. [http://www.imr.no/publikasjoner/andre\\_publikasjoner/havforskningsrapporten/nb-no](http://www.imr.no/publikasjoner/andre_publikasjoner/havforskningsrapporten/nb-no)
- Johansen, L., Colquhoun, D., Hansen, H., Hildre, S., Wergeland, H., Mikalsen, H.E., 2016. Analyse av sykdomsrelatert risiko forbundet med bruk av villfanget og oppdrettet rensefisk for kontroll av lakselus.
- Johnsen, B.O., Jensen, A.J., 1994. The spread of furunculosis in salmonids in Norwegian rivers. *J. Fish Biol.* 45, 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01285.x>
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices. *Bioinformatics* 8, 275–282. <https://doi.org/doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Judelson, H., 2006. Guidelines for designing primers 1–5.
- Jukes, T.H., Cantor, C., 1969. Evolution of protein molecules. *Mamm. Protein Metab. Academic P*, 21–132.
- Kämpfer, P., Glaeser, S.P., 2012. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era - the polyphasic approach revisited. *Environ. Microbiol.* 14, 291–317. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02615.x>
- Kimura, M., 1980. Evolutionary Rates models. *J. Mol. Evol* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2567–2572. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97190-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97190-X)
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolution Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33.
- Lam, H.Y.K., Clark, M.J., Chen, R., Chen, R., Natsoulis, G., Huallachain, M.O., Dewey, F.E., Habegger, L., Ashley, E.A., Gerstein, M.B., Butte, A.J., Ji, H.P., Snyder, M., 2012. Analysis Performance comparison of whole-genome sequencing platforms 30. <https://doi.org/10.1038/nbt.2065>
- Larsen, J.L., Pedersen, K., 1999. Fiskehelse og fiskesykdommer - Infeksjon med *vibrio* bakterier 68–74.
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E., 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 892–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>
- Lindstedt, B., 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic 2567–2582. <https://doi.org/10.1002/elps.200500096>
- MacDonell, M.T., Colwell, R.R., 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and Recommendation for Two New



- Genera, *Listonella* and *Shewanella*. Syst. Appl. Microbiol. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80051-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80051-5)
- Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E., Morelli, G., Russell, J., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D., Feavers, I., Achtman, M., Spratt, B., 1998. Multilocus sequence typing : A portable approach to the identification of clones within populations of. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3140–3145.
- Marples, R.R., Rosdahl, V.T., 1997. International quality control of phage typing of *Staphylococcus aureus*. International Union of Microbial Societies Subcommittee. J. Med. Microbiol. 46, 511–516. <https://doi.org/10.1099/00222615-46-6-511>
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., Vos, P. De, Willems, A., 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies : a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* ( including former *Sinorhizobium* ) 200–214. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65392-0>
- Martínez-Picado, J., Alsina, M., Blanch, A.R., Cerdà, M., Jofre, J., 1996. Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 62, 443–449.
- Matejusova, I., Bain, N., Colquhoun, D.J., Feil, E.J., Mccarthy, U., Mclennan, D., Snow, M., Verner-jeffreys, D., Wallace, I.S., Weir, S.J., Hall, M., 2013. genotyping of *Renibacterium salmoninarum* , a bacterium causing bacterial kidney disease in salmonid fish 1–8.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., Göker, M., 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies the next generation. Nat. Rev. Genet. 11, 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Mikkelsen, Helene; Lund, Vera; Martinsen, Lene-Catrin; Gravningen, K., Bjørgan, M., 2007. Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod ( *Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies 266, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.041>
- Murray, P.R., 1990. Medical MICROBIOLOGY. Bacteriology 3–37.
- Naka, H., Dias, G.M., Thompson, C.C., Dubay, C., Thompson, F.L., Crosa, J.H., 2011. Complete Genome Sequence of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Harboring the pJM1 Virulence Plasmid and Genomic Comparison with Other Virulent Strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii* □ † 79, 2889–2900. <https://doi.org/10.1128/IAI.05138-11>
- NCBI, 2019. BLAST. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
- Nilsen, A., Viljugrein, H., Røsæg Vikan, M., Colquhoun, D., 2014. Veterinærinstituttets rapportserie Rensefiskhelse – kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker.
- Norgessjømatråd, 2019. Sjømatekspert for 99 milliarder i 2018. <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomatekspert-for-99-milliarder-i-2018/>.
- NORM/NORM-VET, 2017. NORM NORM - VET. Usage Antimicrob. Agents Occur. Antimicrob. Resist. Norw. .Tromsø / Oslo 2018. ISSN1502-2307 / 1890-9965.
- Nyberg, E., Nyborg, K., Liberg, A.N.N.M., 2015. En mikrobiologisk revolusjon. 23–26.
- Ohno, S., 1970. Evolution by Gene Duplication.134-67
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y., Skjermo, J., 2012. Verdiskaping basert på produktive hav i 2050 Rapport fra en arbeidsgruppe oppnevnt av Det Kongelige Norske Videnskabers Selskab (DKNVS) og Norges Tekniske Vitenskapsakademi (NTVA) 78.
- Olsen, J.E., Brown, D.J., Skov, M.N., Christensen, J.P., 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. Vet. Q. 15, 125–135. <https://doi.org/10.1080/01652176.1993.9694390>

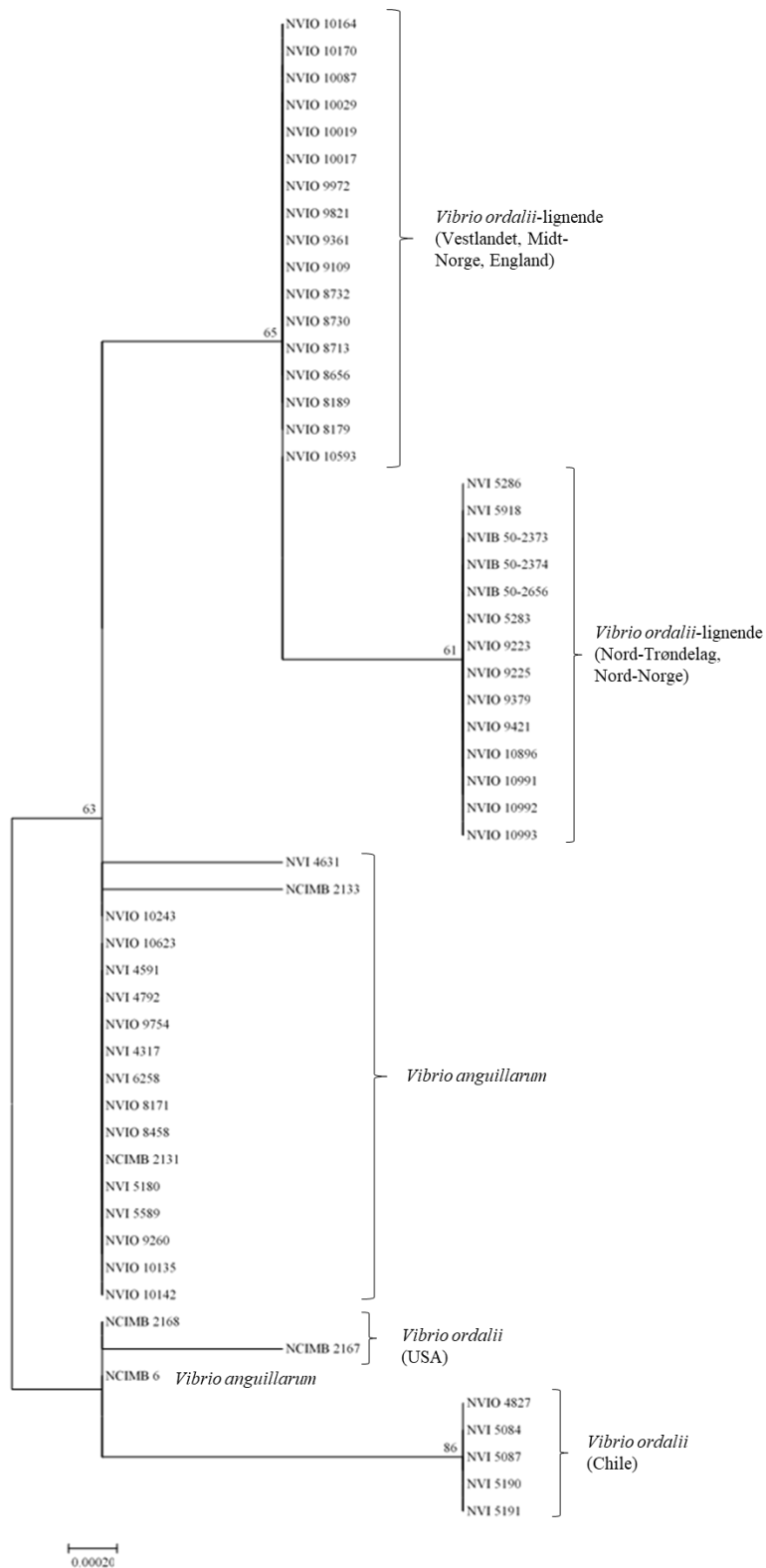
- Parkhill, J., Wren, B.W., 2011. Bacterial epidemiology and biology - lessons from genome sequencing 1–7. <http://genomebiology.com/2011/12/10/230>
- Pazos, F., Santos, Y., Magarinos, B., Bandin, I., Nunez, S., Toranzo, A.E., 1993. Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2969–2976.
- Pedersen, K., Grisez, L., Houdt, R. Van, Tiainen, T., Ollevier, F., Larsen, J.L., 1999. Extended Serotyping Scheme for *Vibrio anguillarum* with the Definition and Characterization of Seven Provisional O-Serogroups 38, 183–184.
- Poblete-Morales, M., Irgang, R., Henríquez-Núñez, H., Toranzo, A.E., Kronvall, G., Avendaño-Herrera, R., 2013. *Vibrio ordalii* antimicrobial susceptibility testing-Modified culture conditions required and laboratory-specific epidemiological cut-off values. *Vet. Microbiol.* 165, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.024>
- Popovich, K.J., Snitkin, E.S., 2017. Whole Genome Sequencing — Implications for Infection Prevention and Outbreak Investigations. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0570-0>
- Powell, A., Treasurer, J.W., Pooley, C.L., Keay, A.J., Lloyd, R., Imsland, A., Garcia de Leaniz, C., 2017. Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Rev. Aquac.* 10, 683–702. <https://doi.org/10.1111/raq.12194>
- Powell, A., Treasurer, J.W., Pooley, C.L., Keay, A.J., Lloyd, R., Imsland, A.K., Garcia de Leaniz, C., 2018. Use of lumpfish for sea-lice control in salmon farming: challenges and opportunities. *Rev. Aquac.* 10, 683–702. <https://doi.org/10.1111/raq.12194>
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., Gu, Y., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms : comparison of Ion Torrent , Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers.
- Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S., Depart-, J.L.F., 1984. Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon \* 107–115.
- Ranwez, V., Gascuel, O., 2002. Improvement of distance-based phylogenetic methods by a local maximum likelihood approach using triplets. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1952–1963. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004019>
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F., Baranton, G., 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia* Printed in Great Britain 873–881. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64050-0>
- Rimstad, E., Basic, D., Gulla, S., Hjeltnes, B., Mortensen, S., 2017. Risk assessment of fish health associated with the use of cleaner fish in aquaculture.
- Rosenberg, M., Kumar, S., 2000. Traditional Phylogenetic Reconstruction Methods Reconstruct Shallow and Deep Evolutionary Relationships Equally Well. *Mol. Biol.* 1823–1827.
- Ruiz, P., Poblete-morales, M., Irgang, R., Toranzo, A.E., Avendaño-herrera, R., 2016. Survival behaviour and virulence of the fish pathogen *Vibrio ordalii* in seawater microcosms 120, 27–38. <https://doi.org/10.3354/dao03005>
- Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Diji, J.M. Van, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance (PDF Download Available) 1–15. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1700278> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for t 239, 487–491.
- Salipante, S.J., Hall, B.G., 2011. Inadequacies of minimum spanning trees in molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3568–3575. <https://doi.org/10.1128/JCM.00919-11>
- Sanger, F., Nicklen, S., 1977. DNA sequencing with chain-terminating 74, 5463–5467.

- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., Thompson, F.L., 2007. Inferring the evolutionary history of *vibrios* by means of multilocus sequence analysis. *J. Bacteriol.* 189, 7932–7936. <https://doi.org/10.1128/JB.00693-07>
- Schiewe, H., Ordal, J., 1977. Deoxyribonucleic acid relationships among marine *vibrios* pathogenic to fish.
- Schiewe, M.H., Trust, T.J., Crosa, J.H., 1981. Current Microbiology *Vibrio ordalii* sp. nov. " A Causative Agent of Vibriosis in Fish 6, 343–348.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67–75. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5)
- Sharma-Kuinkel, B.K., Rude, T.H., Jr, V.G.F., 2016. Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 12, 79–81. <https://doi.org/10.1007/7651>
- Silva-rubio, A., Acevedo, C., Magariños, B., Jaureguiberry, B., Toranzo, A.E., Avendaño-herrera, R., 2008. Antigenic and molecular characterization of *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile 79, 27–35. <https://doi.org/10.3354/dao01872>
- Sinden, R., Alkek, A.B., 1994. *DNA Structure and Function* 245–260.
- Skiftesvik, A.B., Mortensen, S., Bjelland, R.M., 2015. Bruk av rensefisk – muligheter og begrensninger 26–28.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* 4, 89–101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Sørensen, U.B.S., Larsen, J.L., 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum* 129, 593–597.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, A.D., Ka, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Swings, J., Tru, H.G., Ward, A.C., Whitman, W.B., 2002. TAXONOMIC Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology 1043–1047. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02360-0.02360>
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic Note : A Place for DNA-DNA Reassociation and s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology 846–849.
- Statistisk Sentralbyrå, 2018. Akvakultur. (SSB). <https://www.ssb.no/sok?sok=akvakultur>.
- Steinum, T.M., Karataşb, S., Martinussenc, N.T., Meirellesd, P.M., Thompsond, F.L., Colquhounc, D.J., 2016. Multilocus sequence analysis of close relatives *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5496–5504. <https://doi.org/10.1128/AEM.00620-16>.
- Suau, A., Bonnet, G.I.S., Sutren, N.E., Godon, J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J., 1999. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut 65, 4799–4807.
- Tandem Repeat Sequences, 1999. Tandem Repeat Sequences. *Med. Subj. Head. Nucleic Acids Research*, 27(2), 573–580. <http://www.ncbi.nlm.nih>
- Tang, Y.-W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J., 2002. *Molecular Medical Microbiology* Volume 1, Second Edition.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V., 1997. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. *Soc. Healthc. Epidemiol. Am.* 18, 426–439.
- Thermo Fisher Scientific, 2005. 260/280 and 260/230 Ratios. *NanoDrop Prod.* 2–3.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Hoste, B., Munn, C.B., Swings, J., Naser, S., 2005. Phylogeny and Molecular Identification of *Vibrios* on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5107–5115. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5107>
- Thompson, F.L., Gomez-gil, B., Teresa, A., Vasconcelos, R., Mathematics, C., 2007a. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* form distinct species 73, 1–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00020-07>
- Thompson, F.L., Gomez-gil, B., Teresa, A., Vasconcelos, R., Sawabe, T., 2007b. Multilocus Sequence Analysis

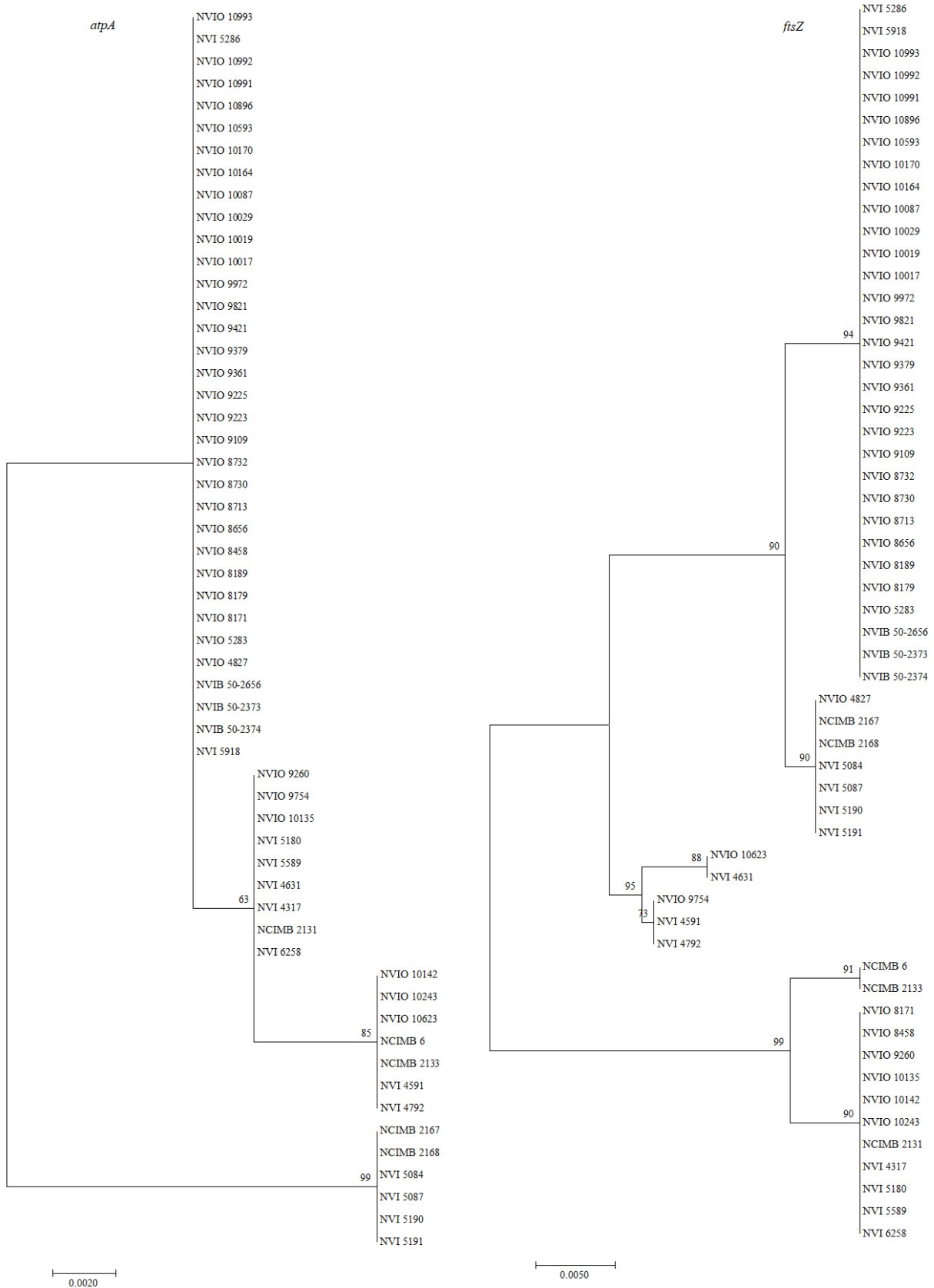
Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* Are Distinct Species □ † 73, 4279–4285.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00020-07>

- Thompson, F.L., Thompson, C.C., Dias, G.M., Naka, H., Dubay, C., Crosa, J.H., 2011. The genus *Listonella* MacDonell and Colwell 1986 is a later heterotypic synonym of the genus *Vibrio* Pacini 1854 ( Approved Lists 1980 ) – a taxonomic opinion 1854, 3023–3027. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030015-0>
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Avendaño-Herrera, R., 2017. Vibriosis: *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii* and *Aliivibrio salmonicida*. Fish viruses Bact. Pathobiol. Prot. 314–333.  
<https://doi.org/10.1079/9781780647784.0314>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O.T., Nilsen, F., 2013. Review Salmon lice – impact on wild salmonids and salmon aquaculture 171–194. <https://doi.org/10.1111/jfd.12061>
- Urwin, R., Maiden, M.C.J., 2003. Multi-locus sequence typing : a tool for global epidemiology 11, 479–487.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
- Van Belkum, A., 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 49, 22–27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00173.x>
- Van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H., 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 275–93. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.02.008>
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. 13, 1–46.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>
- Veterinærinstituttet, 2019. Sekvenseringsprotokoll - Sangers metode - TE07\_023.
- Viscidi, R.P., Demma, J.C., 2003. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* housekeeping genes. J. Clin. Microbiol. 41, 197–204. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.197-204.2003>
- Wei, K., Zhang, T., Ma, L., 2018. Divergent and convergent evolution of housekeeping genes in human–pig lineage. PeerJ 6, e4840. <https://doi.org/10.7717/peerj.4840>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study 173, 697–703.
- Wienerroither, R., Johannesen, E., Dolgov, A., Byrkjedal, I., Bjelland, O., Drevetnyak, K., Eriksen, K.B., Høines, Å., Langøy, H., Prokhorova, D., Wenneck, T., 2011. Atlas of the Barents Sea fishes. IMR/PINRO Jt. Rep. Ser. 1-2011 1–272.
- Wiklund, T., Bylund, G., 1987. salmonid fish in Finland. Diseases of aquatic organisms 6, 13-19.
- Williams John G.K., Kubelik Anne R., Livak Kenneth J., Rafalski J.Antoni, Tingey Scott V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531–6535.
- Woo, T., P., Bruno, D., 1999. Fish disease and disorders Volume 3 - Viral, Bacterial and Fungal Infection 523–558.
- Wootton, R., 1992. Fish Ecology 310–331.
- Zaidi, N., Konstantinou, K., Zervos, M., 2003. The Role of Molecular Biology and Nucleic Acid Technology in the Study of Human. Mol. Methods Hum. Infect. 127, 1099.
- Zhang, W., Jayarao, B.M., Knabel, S.J., 2004. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of. Society 70, 913–920.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.913>

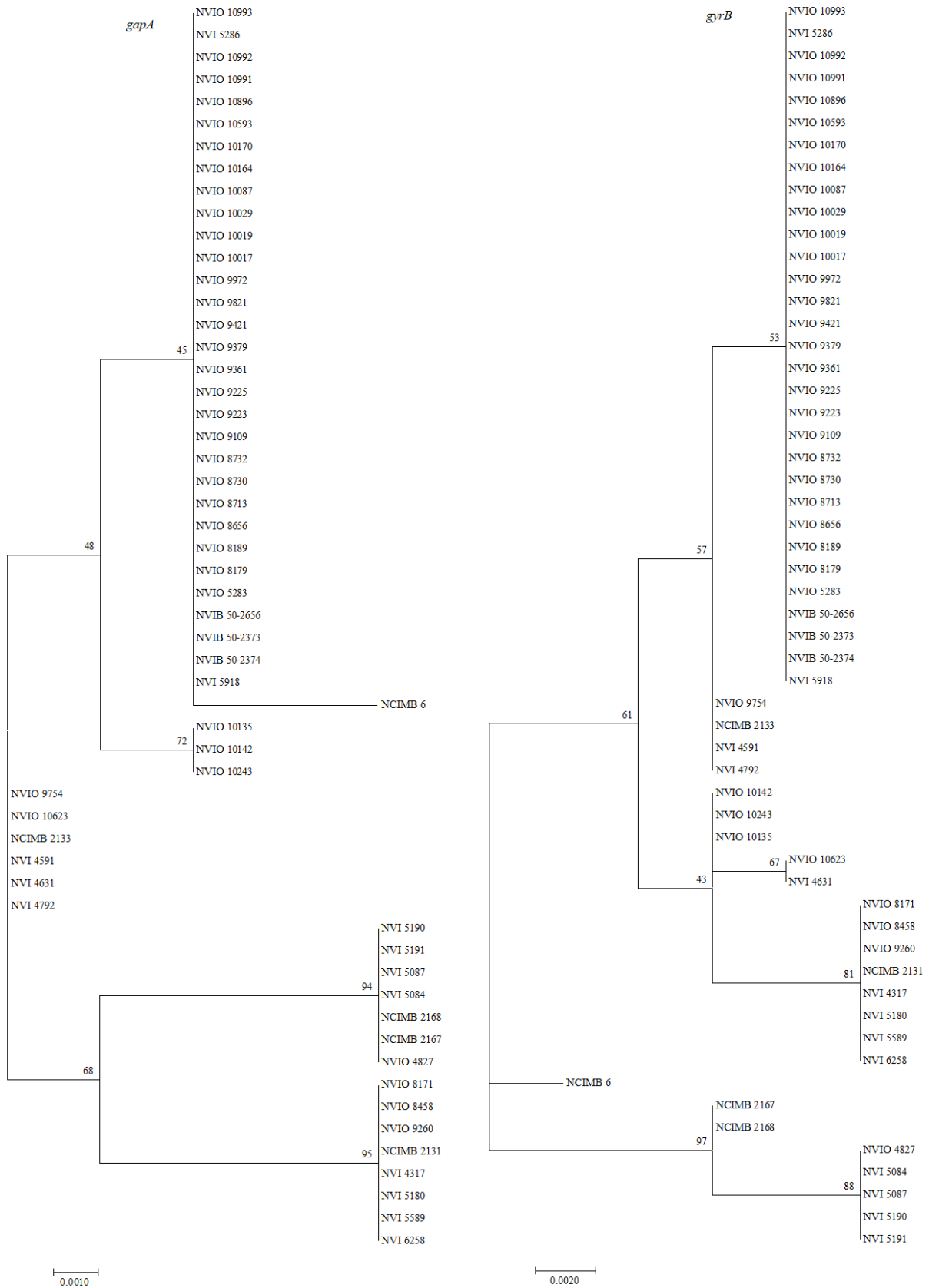
# Vedlegg



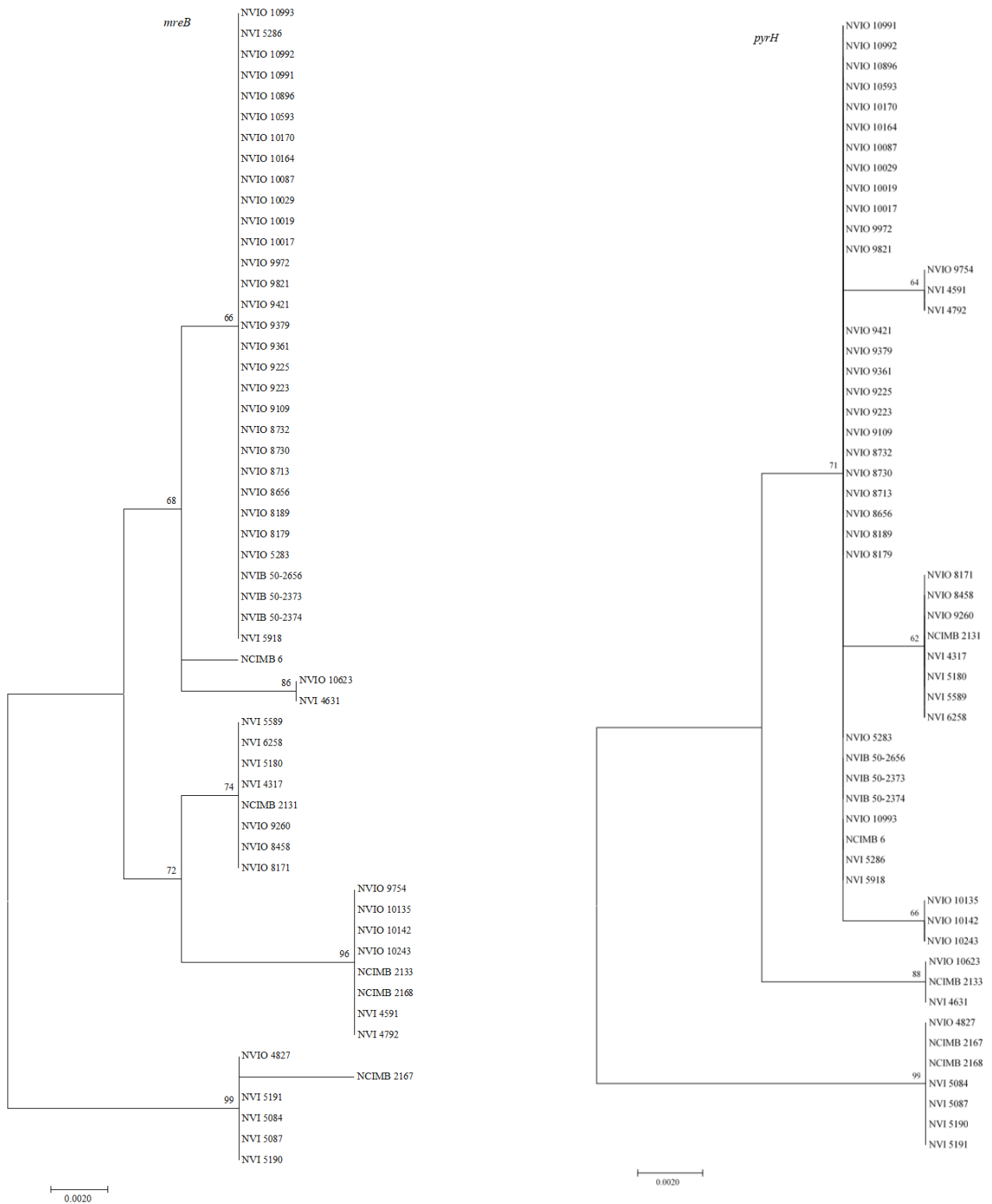
Figur 5.1 - ML tre basert på 56 sammensatte aminosyresekvenser (1297 nt) av alle åtte gener. JTT matrix-basert modell brukt som best passende substitusjonsmodell (Jones et al. 1992). Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA7 (Kumar et al., 2016). Skala 0,00020



Figur 5.2 – Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor, 1969) av *atpA*-genet (516 bp) og *ftsZ*-genet (456 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0020(*atpA*)/0,0050(*ftsZ*)

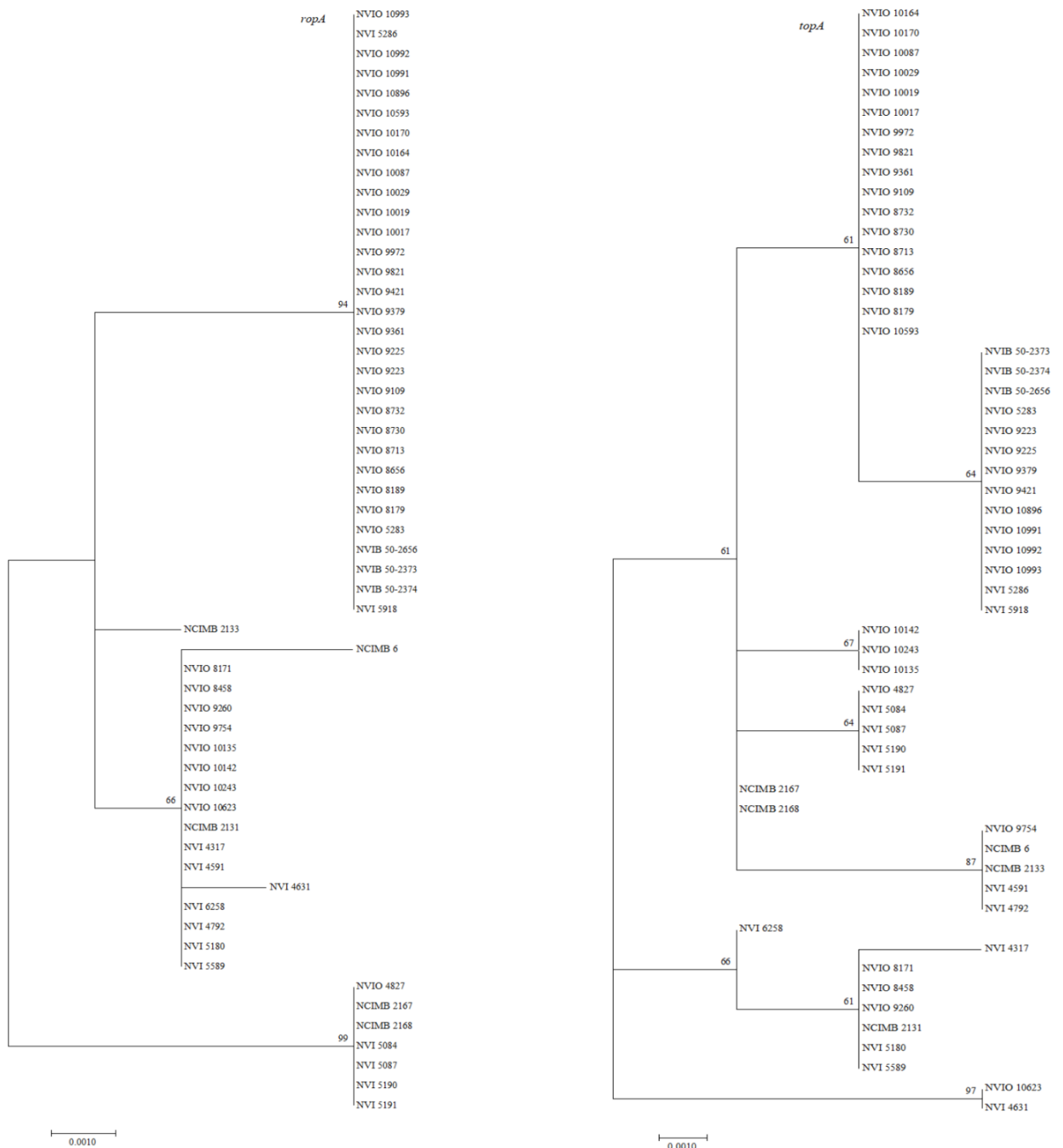


Figur 5.3 - Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor, 1969) av *gapA*-genet (483 bp) og *gyrB*-genet (405 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0010(*gapA*)/0,0020(*gyrB*)



Figur 5.4 - Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor, 1969) av *mreB*-genet (495 bp) og *pyrH*-genet (399 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0020





Figur 5.5 - Individuell fylogenetisk analyse med ML-metoden basert på Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor, 1969) av *ropA*-genet (744 bp) og *topA*-genet (393 bp). Analysene involverer 56 nukleotid sekvenser. Bootstrap-verdi; 500 repetisjoner. Analysen er utført i MEGA 7. Skala 0,0010