

***'Pasteurella atlantica genomovar salmonicida'* –  
studier av overlevelse, evne til biofilmdannelse og  
antibiogram**

Thorvald Bø



Masteravhandling i fiskehelse – akvamedisin

Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen, Norge

Juni 2023

© Thorvald Bø

2023

*Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* – studier av overlevelse, evne til biofilmdannelse og antibiogram

Universitetet i Bergen, 2023

## Forord

Denne masteroppgaven er del av det FHF-finansierte prosjektet «Pasteurellose hos norsk laks» ved Veterinærinstituttet, prosjektnummer: 901680. Arbeid i forbindelse med masteroppgaven er gjennomført ved Veterinærinstituttet i Bergen.

En stor takk til veilederne mine, Duncan Colquhoun og Hanne Nilsen! Tusen takk for en spennende oppgave. Dere har vært så støttende, hjelpsomme, tålmodige og engasjerte. Jeg er utrolig takknemlig for at dere har viet så mye tid til rådgivning og veiledning. Jeg ønsker også å si tusen takk for at dere har vært så tilgjengelige, både i arbeidstid, helger og ferier – det betyr veldig mye.

Videre vil jeg si tusen takk til ingeniørene ved Veterinærinstituttet i Bergen, Kirsten Liland Bottolfsen, Henriette Kvalvik, Kari Marit Sandnes, Merete Gåsvær Sture og Torill Thoreby Jensen. Dere har vært utrolig tålmodige og hjelpsom med alt av labarbeid, og dere har lært meg så mye. Tusen takk for at dere har inkludert meg så godt. Dere er en helt fantastisk gjeng, og jeg har hatt det veldig artig i lag med dere! Jeg kommer til å savne alle de gode samtalene på labben, rundt lunsjbordet og ved morgenkaffen.

Tusen takk til resten av de ansatte ved Veterinærinstituttet i Bergen, for all støtte gjennom året og ikke minst for at dere har inkludert meg så godt i gjengen. Det har vært et utrolig fint år i lag med dere!

Tusen takk til David Strand ved Veterinærinstituttet i Ås, som tilbrakte en uke i Bergen, bare for å hjelpe meg med labarbeid. Tusen takk til Anita Rønneseth og fiskeimmunologigruppen ved UiB, for lån av inkubatorer.

Tusen takk til min samboer, Margrethe Vindenes, for all støtte gjennom året. Jeg vil også takke min far, Lars Bø, for korrekturlesing.

Til slutt må jeg si tusen takk til mine medstudenter. Det har vært et privilegium å få tilbringe studietiden sammen med så fine folk og jeg kommer til å se tilbake på disse fem årene som et høydepunkt i livet.

## Sammendrag

Pasteurellose forårsaket av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' er en sykdom som gir store velferdsproblemer hos laks i Norge. Siden 2018 har sykdommen etablert seg som en pågående epidemi på vest-kysten av Norge.

Det er kunnskapshull knyttet til smittespredning av sykdommen. Denne oppgaven tar for seg å dekke noen av disse kunnskapshullene ved å studere miljøoverlevelsen til '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' ved ulike temperaturer i mikrokosmer. I denne studien ble det funnet at bakterien ikke er dyrkbar i lang tid når den inkuberes i naturlig sjøvann. Videre er det vist at dyrkbarheten til bakterien påvirkes av temperatur, der overlevelse muligens er noe lenger ved lavere vanntemperatur. Den korte dyrkbarheten til bakterien indikerer at det vannbårne smittepotensialet til bakterien trolig er relativt kort, uansett vanntemperatur. Til tross for den korte tiden hvor bakterien var dyrkbar, var dens genetiske materiale detekterbart gjennom hele forsøksperioden.

'*Pasteurella atlantica*' bakteriene er saktevoksende, og i diagnostikken kan deres vekst ofte kamoufleres av mer hurtigvoksende bakterier fra miljøprøver, eller ved direkteutstryk i felt. På bakgrunn av dette ble det gjort sensitivitetsundersøkelser for en rekke forskjellige antibiotika, med formål om å utvikle en selektiv agar. Fra dette arbeidet ble utvalgte antibiotikum testet på ulike stammeisolater av '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' og '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' for å kartlegge eventuelle intra-taksonomiske sensitivitetsvariasjoner. Dette ble gjort for at det selektive vekstmediumet skulle ha en mest mulig bredtvirkende effekt. Det ble funnet at clindamycin og neomycin var særlig aktuelle preparater for videre arbeid.

Til slutt ble det gjort innledende studier av evnen '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' har til å danne biofilm i kunstig og autoklavert sjøvann. I forsøket ble det funnet indikasjoner på at bakterien ikke er sterkt biofilmdannende. Det lyktes ikke å påvise biofilmdannelse i forsøket.

## Forkortelser

µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
AA	Andre arter, kolonier som ikke er <i>Pasteurella</i>
BA	Blodagar
BAS	Blodager med 2% NaCl
CCUG	Culture collection, University of Göteborg
CFU	Kolonidannendeenheter
CMS	Kardiomyopatisyndrom
Ct	Cycle threshold
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS	Ekstracellulær polymerisk substans
FBS	Fetal bovine serum
g	Gravitasjon
MA	Marineagar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption-Time of Flight Mass Spectrometry
MK	Mikrokosme
NaCl	Natriumklorid
ng	Nanogram
NK	Negativ kontroll
Nm	Nanometer
OD	Optisk tetthet
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PO	Produksjonsområde
PTK	Positiv kontroll
qPCR	Kvantitativ Polymerase kjedereaksjon
RPM	Revolutions per minute

rRNA	Ribosomalt ribonukleinsyre
TSBSS	Tryptic Soy Broth med 2% NaCl og 10% Fetalt Bovinet Serum
UV	Ultraviolet
VBNC	Viable but not culturable
VIB	Veterinærinstituttet i Bergen

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon</b>	<b>1</b>
1.1	Bakteriesykdommer i norsk akvakultur	1
1.2	'Pasteurellose' hos fisk	2
1.3	'Ekte' pasteurellose hos fisk	3
1.3.1	Pasteurellose i norsk akvakultur	3
1.3.2	<i>Pasteurella skyensis</i>	3
1.3.3	Reservoar og taksonomisk avklaring for norske <i>Pasteurella</i> spp.	4
1.3.4	' <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>cyclopteri</i> '	5
1.3.5	' <i>Pasteurella atlantica</i> genomovar <i>salmonicida</i> '	6
1.3.6	Dyrkning og fenotypiske egenskaper ' <i>Pasteurella atlantica</i> '	6
1.4	Overlevelse i miljøet – bruk av mikrokosmer	7
1.5	Selektiv medier	8
1.6	Biofilm	8
1.7	Bakgrunn og mål for studiet	9
<b>2</b>	<b>Materiale og metode</b>	<b>10</b>
2.1	Bakterieisolater som er brukt i studien	10
2.2	Oppdyrking og forkultur i vekstmedium	11
2.3	Måling av optisk tetthet (OD)	11
2.4	Undersøkelse av dyrkbartetthet ved bruk av fortynningsrekke	12
2.5	MALDI-TOF MS	13
2.6	Undersøkelse av vekstdynamikk for ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ', ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ' og <i>Pasteurella skyensis</i> i TSBSS ved måling av optisk tetthet	13
2.7	Gramfarging av ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ' i TSBSS	14
2.8	Vekstforsøk 1 og 2: Vekstdynamikk undersøkt ved måling av OD, CFU og Ct-verdi for ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ' i TSBSS	14
2.8.1	Fortynningsrekke for bestemmelse av kolonidannende enheter	15
2.8.2	DNA ekstraksjon fra bakteriekultur for qPCR-analyse	15
2.9	Miljøoverlevelse i mikrokosmer	16
2.9.1	Kartlegging av dyrkbartetthet og diversitet i mikrokosmene	18
2.9.2	Filtrering av vannprøver ved bruk av nitrocellulosefilter	18
2.9.3	DNA-ekstraksjon fra nitrocellulosefilter	19
2.9.4	Undersøkelse av veksthemming fra miljøbakterier i mikrokosmer evner til å hemme vekst av ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> '	19
2.10	Måling av templat DNA for konsentrasjon og renhet	20
2.11	Real time qPCR analyse	20
2.12	Resistensundersøkelse av ' <i>P. atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ', ' <i>P. atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ' og <i>P. skyensis</i> ved bruk av agardiffusjonstesting	22
2.12.1	Sensitivitetsvariasjoner mellom intrataksonomiske grupper for utvalgte antibiotika	23
2.13	Studie av biofilmdannelse for ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ' i ulike typer sjøvann	24
<b>3</b>	<b>Resultater</b>	<b>26</b>
3.1	Vekstdynamikk i TSBSS	26
3.1.1	Undersøkelser av gramfarget ' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ' i TSBSS kultur	26

3.2	<i>Vekstforsøk 1 og 2: Sammenligning av vekstdynamikk i TSBSS undersøkt ved måling av OD, CFU og Ct-verdier for 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida'</i> .....	27
3.3	<i>Undersøkelse av miljøoverlevelse hos 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' i mikrokosmer</i> .....	31
3.3.1	Miljøoverlevelse ' <i>P. atlantica gv. salmonicida</i> ' ved ulike temperaturer .....	32
3.3.2	Populasjonsdynamikk i mikrokosmer ved ulike temperaturer .....	34
3.3.3	Populasjonsdynamikk i mikrokosmer: identifisering av dyrkbare kolonier.....	36
3.3.4	Undersøkelse av veksthemming .....	37
3.3.5	qPCR basert estimering av ' <i>P. atlantica gv. salmonicida</i> ' overlevelse .....	39
3.4	<i>Agardiffusjon: Undersøkelse av antibiotikasensitivitet</i> .....	44
3.4.1	Sensitivitetsforskjeller innad i taksonomiske grupper av ' <i>P. atlantica gv. salmonicida</i> ' og ' <i>P. atlantica gv. cyclopteri</i> ' .....	47
3.5	<i>Biofilmdannelse i kunstig og autoklavert sjøvann</i> .....	49
<b>4</b>	<b>Diskusjon</b> .....	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Konklusjon og videre arbeid</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Referanseliste</b> .....	<b>63</b>



# 1 Introduksjon

## 1.1 Bakteriesykdommer i norsk akvakultur

Den norske akvakulturindustrien hadde sin spede begynnelse på slutten av 60-tallet. Siden den gang har industrien hatt en enorm vekst, og har blitt en av Norges viktigste eksportindustrier. I løpet av 2022 ble det slaktet over 1,5 millioner tonn atlantisk laks (*Salmo salar* L.) til en verdi av over 110 milliarder kroner (Fiskeridirektoratet, 2023; Norsk sjømatråd, 2023). Til tross for rekordhøy eksportverdi, og at næringen generelt betraktes som vellykket, ble det i 2022 registrert en gjennomsnittlig dødelighet på 17,1 % for laks i sjøfasen, noe som tilsvarer over 56 millioner fisk (Oliveira et al, 2023; Fiskeridirektoratet, 2023). Denne høye dødelighetsraten har sannsynligvis flere årsaker. Infeksiøse sykdommer, parasitter, håndteringer og dårlig vannkvalitet kan alle være forbundet med forøket dødelighet og redusert fiskevelferd.

Gjennom historien til norsk akvakultur har det vært flere bakteriesykdommer av endemisk og epizootisk utbredelse som har ført til store tap i næringen. På slutten av 70-tallet var kaldtvannsvibriose forårsaket av *Aliivibrio (Vibrio) salmonicida* et stort problem for oppdrettere av atlantisk laks (Egidius et al., 1981). Mot midten av 80-tallet ble *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* importert med infisert laksesmolt fra Skottland og førte til hyppig forekomst av klassisk furunkulose hos laksefisk langs norskekysten (Pope & Bergh, 1999). Videre har *Vibrio anguillarum* med sykdommen klassisk vibriose gitt store tap i oppdrett av både laks, regnbueørret og torsk siden den først ble beskrevet i Norge i 1964 (Holt, 1970; Myhr et al., 1991). Som et virkemiddel i bekjempelsen av bakteriesykdommer var det i 1987 et antibiotika forbruk på ca. 48 000 kilo aktivt virkestoff til tross for at den totale produksjonen var en brøkdel sammenlignet med hva den er i dag (Grave et al., 1990). Antibiotikaforbruket ble redusert fra slutten av 80-tallet etter introduksjonen av oljebaserte stikkvaksiner med inaktiverede bakterier til et forbruk på om lag 400 kilo aktivt virkestoff i 2022 (Folkehelseinstituttet, 2023; Pope & Bergh, 1999). Den vellykkede introduksjonen av vaksiner ansees å ha vært avgjørende for at akvakulturnæringen har kunne vokse til hva den er i dag (Brudeseth et al., 2013). Det har de senere årene også kommet strengere reguleringer for å bekjempe og forebygge spredning av sykdommer. I dyrehelseforskriften (2022, §§ 6-15) fremkommer en rekke tiltak som oppdretter pålegges ved mistanke eller påvisning av listeførte sykdommer. Til tross for utstrakt bruk av vaksiner og strengere reguleringer er imidlertid bakteriesykdommer fortsatt et vesentlig problem i norsk akvakultur. I den årlige

spørreundersøkelsen av fiskehelsepersonell i forbindelse med utgivelse av Fiskehelse rapporten for 2022, var infeksjoner med *Moritella viscosa*, *Tenacibaculum* spp., *Pasteurella* sp., og *Yersinia ruckeri* (yersinose) funnet å være de bakteriesykdommene som forårsaket mest helseproblemer for laks i sjøfasen (Sommerset et al, 2023). De mest fremtredende helseproblemene for laks i matfiskanlegg ble oppgitt å være gjellesykdommer, mekaniske skader knyttet til avlusning, infeksjoner med *Moritella viscosa* og kardiomyopatisyndrom (CMS) (Sommerset et al, 2023).

## 1.2 ‘Pasteurellose’ hos fisk

Pasteurellose ble for første gang beskrevet hos fisk fra østkysten av USA, etter at det i 1963 ble observert en halvering av havabbor bestanden i øvre del av Chesapeake Bay (Snieszko et al., 1964). Etter undersøkelser av syk fisk ble det isolert bakterier som ga sterk polar farging samtidig som bakteriene delte flere fysiologiske karakteristikk som var forenelig med *Pasteurella* genuset (Snieszko et al., 1964). Videre studier av bakteriens morfologi og fysiologi basert på kriteriene framsatt i Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Microbiology. et al., 1957) viste tilstrekkelige ulikheter fra andre etablerte arter av *Pasteurella* til at dette ble vurdert å være en ny art (Janssen & Surgalla, 1968). Dermed ble *P. piscicida* i 1968 foreslått som ny art innenfor *Pasteurella* genuset (Janssen & Surgalla, 1968). På begynnelsen av 70-tallet forårsaket bakterieinfeksjoner med *Pasteurella piscicida* store tap i havabboroppdrett i Japan (Yamaoka & Kusuda, 1972) før den mot slutten av 80-tallet ble beskrevet fra oppdrett av stripet havabbor (*Morone saxatilis*) i USA (Hawke et al., 1987). Samtidig var der beskrivelser av funn av *Pasteurella* lignende bakterier i Norge og Ungarn på henholdsvis brunørret (*Salmo trutta*) og europeisk malle (*Silurus glanis*) (Farkas & Olah, 1984; Hårstein & Bullock, 1976). Beskrivelsen fra brunørret ble senere avkrefet da de bakteriene ble identifisert som atypisk *Aeromonas salmonicida* (D. Colquhoun, pers. kom., 2023). På tidlig 90-tall begynte en i Europa å se et økende antall beskrivelser av forekomster med *P. piscicida* bakterier, som følge av dette økte interessen for bakterien (Gauthier et al., 1995). Under studier av bakteriens morfologi, fysiologi og gjennom utvikling av plasmid spesifikke DNA prober basert på hva en antok var beslektede bakterier oppstod det etterhvert usikkerhet rundt taksonomien til *Pasteurella piscicida* (De Ley et al., 1990; Egusa & Simidu, 1972; Ruimy et al., 1994; Zhao & Aoki, 1992). Til slutt ble det gjennom analyse av bakteriens rRNA sekvenser avdekket at *P. piscicida* og *Photobacterium damsela* var monofyletiske (Gauthier et al., 1995). Likevel ble det i tilstrekkelig grad avdekket biokjemiske og morfologiske forskjeller som gjorde at en kunne

skille de to (Gauthier et al., 1995). Derfor ble det foreslått en navneendring for *Pasteurella piscicida* til navnet *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, med plassering i genuset *Photobacterium* (Gauthier et al., 1995). På bakgrunn av dette var tidligere beskrivelser av sykdom forårsaket av *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* som pasteurellose, egentlig feil.

### 1.3 ‘Ekte’ pasteurellose hos fisk

*Pasteurellaceae* familien består av en rekke kommensalistiske, opportunistiske og primær patogene gram-negative bakterier (Ellul et al., 2021). Familien bestod originalt av kun 3 forskjellige genus, men det har senere blitt karakterisert 28 forskjellige genus (Christensen & Bisgaard, 2018). Blant disse finner en *Pasteurella*-genuset som har et bredt vertsspekter (Ellul et al., 2021).

#### 1.3.1 Pasteurellose i norsk akvakultur

Den første beskrivelsen av pasteurellose hos atlantisk laks i Norge kom i 1989 (Valheim et al., 2000). *Pasteurella* ga laksen en hemoragisk og nekrotisk granulomatøs infeksjon av øyet. På bakgrunn av dette ble navnet *Varracalbmi* (blødøye på samisk) foreslått for sykdommen (Valheim et al., 2000). Videre så en hud-ulcerasjoner, nekrose og hemoragiske granulomer i de indre-organer, så vel som nekrose i pseudobranken (Valheim et al., 2000). Det ble sett at sykdommen opptrådte i vinterhalvåret når det var kalde temperaturer og dødeligheten begynte å avta ved varmere vanntemperaturer. Etter 1992 avtok tilfellene med pasteurellose, og det var kun sporadiske tilfeller av pasteurellose hos atlantisk laks (Legård & Strøm, 2020). I 2018 begynte en igjen å se en økende forekomst av Pasteurellose, denne gangen på vestkysten av Norge (Legård & Strøm, 2020). De nye *Pasteurella* infeksjonene viste ikke samme sesongavhengighet som en hadde sett i Nord-Norge på 1990-tallet og opptrådte gjennom hele året (Legård & Strøm, 2020). I tillegg var klinikken annerledes, nå var bylledannelse i hjerte- og skjelettmuskulatur karakteristiske trekk for sykdommen (Nilsen, 2020). Det første bekreftede tilfellet med pasteurellose hos rognkjeks var i Tromsø i 1999 (S. Gulla, pers.kom., 2023).

#### 1.3.2 *Pasteurella skyensis*

Mot slutten av 1990-tallet ble det rapportert økt dødelighet av laks på 3 forskjellige matifskanlegg i Skottland, der fisken viste sykdomstegn og tap av appetitt (Jones & Cox, 1999).

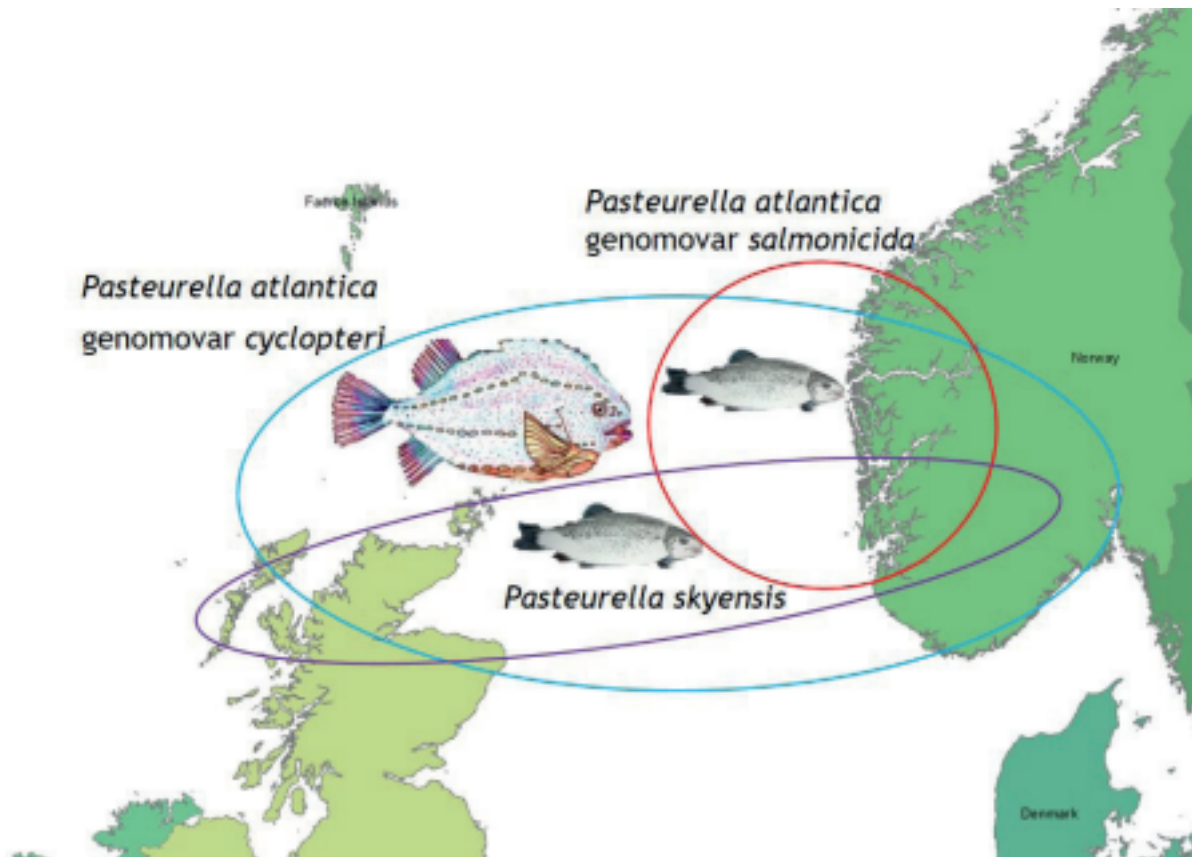
Utstryk fra nyre på trypticase soya agar med 2% salt og 5% blod ga vekst av små, runde og grå kolonier etter inkubering på 20 °C (Jones & Cox, 1999). Bakteriens biokjemiske og fysiologiske egenskaper indikerte at den tilhørte *Pasteurellaceae* familien. Videre undersøkelser av bakteriens 16S rRNA gensekvenser viste fylogenetiske likheter med bakterien *Pasteurella phocoenarum* isolert fra nise. På bakgrunn av dette ble bakterien ble klassifisert som en ny art med navn *Pasteurella skyensis* (Birkbeck et al., 2002).

Klinikk assosiert med *Pasteurella skyensis* infeksjoner er katarakt, petekkier på visceralt fettvev og peritonahinnen, i tillegg til hvite fokale lesjoner i nyre, milt og hjertet (Jones & Cox, 1999). Histopatologisk kan en ved *P. skyensis* infeksjoner se granulomatøse multifokale nekroser i lever, nyre og milt og ved kroniske infeksjoner sees peritonitt og perikarditt (Jones & Cox, 1999). *Pasteurella Skyensis* var frem til 2020 kun funnet å gi sykdom i Skottland, men ble da påvist hos laks på to nærliggende anlegg på Vestlandet etter økt dødelighet (Strøm, S. B., Nilsen, H., 2021).

### 1.3.3 Reservoar og taksonomisk avklaring for norske *Pasteurella* spp.

Det har vært usikkerhet knyttet til den taksonomiske plasseringen av de fiskepatogene *Pasteurella* og det er behov for å kartlegge dens arter, underarter, vertsspekter og geografisk opprinnelse (Gulla et al., 2020). Som et ledd i dette arbeidet har Veterinærinstituttet helgenomsekvensert 80 forskjellige isolater av *Pasteurella*. Resultater fra sekvenseringen viser at det foreligger tilstrekkelig forskjell mellom den skotske *Pasteurella skyensis* og de norske *Pasteurella* isolatene til at de må tilhøre forskjellige arter. Det er genetiske forskjeller også mellom isolatene som har gitt sykdom på atlantisk laks og rognkjeks i Norge fra 2018 av, men den mindre genetiske avstanden mellom dem tyder på at de tilhører samme art (Gulla et al., 2020). Samtidig viser isolatene fra laks på 90-tallet en større diversitet. For å bedre rapportering og diagnostisering av pasteurellose har sykdomsvariantene blitt tildelt foreløpige arbeidsnavn. Den norske *Pasteurella* varianten, som gir sykdom hos atlantisk laks er tildelt navnet '*Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida*'. *Pasteurella* variantene som gir sykdom på rognkjeks er gitt navnet '*Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*' (Gulla et al., 2020).

Det finnes intet kjent reservoar for '*P. atlantica*' isolatene som forårsaker sykdom hos laks og rognkjeks. På bakgrunn av at *P. skyensis* ble plassert i *Pasteurella* genuset som følge av fylogenetisk likheter til et *Pasteurella phocoenarum* isolat fra nise, kan det potensielt eksistere et *Pasteurella*-reservoar hos varmblodige sjøpattedyr (Birkbeck et al., 2002; S. Gulla, pers.kom., 2023).



Figur 1.1: Den geografiske utbredelsen til '*P. atlantica* gv. *salmonicida*', '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' og *P. skyensis*. («Fiskepatogene *Pasteurella* i Norge» av Gulla et al. (2020))

#### 1.3.4 '*Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri*'

Bruken av rensefisk som en biologisk avlusningsmetode har økt det siste tiåret. Fra å sette ut 4,8 millioner rensefisk i merd i 2009, ble det i 2021 satt ut 45 millioner rensefisk til en verdi av over 1 milliard kroner (Fiskeridirektoratet, 2022). Rensefisken som brukes i norsk akvakultur er både villfanget og oppdrettet. Artene som henfaller under rensefisk begrepet er rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) og de forskjellige leppefiskene berggylte (*Labrus bergylta*), bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*), grønngylt (*Symphodus melops*) og gressgylt (*Centrolabrus exoletus*). De vanligste bakteriene som er forbundet med sykdom hos rensefisk er atypisk *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* lignende bakterier, *Vibrio ordalii*-lignende bakterier, *Pseudomonas anguilliseptica* og '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (Erkinharju et al., 2023). I spørreundersøkelsen i forbindelse med utgivelse av fiskehelse rapporten for 2022 oppga 6 av de 44 deltakende i undersøkelsen å ha observert helseproblemer forbundet med *Pasteurella* spp. infeksjoner hos rognkjeks (Sommerset et al, 2023). Infeksjoner med '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' er ikke meldepliktig, så det kan være mørketall i både utbredelse og prevalens. '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' er funnet hos både yngel og stamfisk, og sykdomsutbrudd er

rapportert fra både rognkjeksoppdrett og rognkjeks som kohabiterer med laks i merd (Alarcón et al., 2016). Sandlund et al. foretok i 2021 et smittforsøk for å avklare hvorvidt pasteurellose kan smitte mellom kohabiterende rognkjeks og laks. I studien ble det ikke observert noe klinikk assosiert med pasteurellose hos laksen, samtidig som det ble funnet at rognkjeksens derimot var mottakelig for både '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' og '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' (Sandlund et al., 2021).

### 1.3.5 '*Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida*'

I 2018 begynte en på nytt å se sykdom hos laks som følge av *Pasteurella* spp.-infeksjoner i Norge (Gulla et al., 2020; Legård & Strøm, 2020). Den nye *Pasteurella* spp. varianten, '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*', spredte seg raskt på vestkysten av Norge, og påvises i dag fra produksjonsområde 2 til 5 (PO) (Legård & Strøm, 2020; Nilsen et al, 2023). I 2022 ble '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' påvist ved 52 lokaliteter i Norge, med hovedvekten av påvisninger gjort i PO3 (Nilsen et al, 2023). Det kan være mørketall, ettersom pasteurellose ikke er en meldepliktig sykdom. Klinikk forbundet med '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'- infeksjoner hos laks har vist å variere, både i alvorlighetsgrad, symptomer og i hvilke vev som blir affisert (Legård & Strøm, 2020). Kliniske beskrivelser omfatter bylledannelse i skjelettmuskulatur, pseudobronkier, blødninger og betennelsesreaksjoner i bukorganer, i hjertet og i øyet (Gulla et al., 2020; Legård & Strøm, 2020). Ved histopatologiske undersøkelser sees bakterieaggregat med tilstøtende abscesser, epikarditt og nekrotiserende inflammasjon i de affiserte vev (Gulla et al., 2020; Legård & Strøm, 2020).

### 1.3.6 Dyrkning og fenotypiske egenskaper '*Pasteurella atlantica*'

'*Pasteurella atlantica*' er en gram negativ, ikke-bevegelig og kort stavbakterie (Legård & Strøm, 2020). Bakterien er saktevoksende og gir vekst av små og grå kolonier på blodagarskåler med 2% NaCl (BAS) etter 2 døgn inkubasjon ved 22 °C (Alarcón et al., 2016). Videre vokser den i vekstmediumet Tryptic Soy Broth med 2% NaCl og 10% Fetalt Bovinet Serum (FBS), (TSBSS) (Ellul et al. 2018). I studie hvor det er gjort arginin dihydrolase, lysin og ornithine decarboxylase (ALO) testing beskrives det at bakterien var lite reaktiv og den produserte ikke indol, katalase, gelatinase eller urease (Alarcón et al., 2016). Det finnes vekstkarakteristikk og biokjemiske forskjeller som gjør at en kan skille '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' fra hverandre. Ved mannitolfermenteringstester er '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' positiv, mens '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' er negativ (H. Nilsen, pers.kom., 2023).

Videre vokser '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' en del svakere under anaerobe forhold, sammenlignet med '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' (H. Nilsen, pers.kom., 2023).

#### 1.4 Overlevelse i miljøet – bruk av mikrokosmer

En mikrokosme er en beholder hvor en lager til et kunstig, lukket og simulert økosystem (Beyers, 1964). Bruken av mikrokosmer for å studere miljøoverlevelsen til fiskepatogene bakterier er utbredt (Avendaño-Herrera et al., 2006; Duodu & Colquhoun, 2010; Madetoja et al., 2003; Morgan et al., 1991; Stanley et al., 2002). Mikrokosmer er et godt verktøy for å studere miljøoverlevelse ettersom en kan regulere og monitorere miljøfaktorer som temperatur, salinitet, tilgang på lys, sedimenter, mikroflora og næringsstoffer med formål om å simulere et naturlig miljø (Duodu & Colquhoun, 2010; Lim & Flint, 1989). Hvor lenge en bakterie forblir dyrkbar i et mikrokosmeforsøk ser ut til i stor grad å påvirkes av hvilken type vann som brukes. Da Avendaño-Herrera et al (2006) undersøkte miljøoverlevelse hos *Tenacibaculum maritimum* ble det gjort forsøk med både sterilisert og ikke-sterilt sjøvann. I ikke-sterilt sjøvann ble bakterien funnet å være dyrkbar i maksimum 5 dager, til sammenligning var *T. maritimum* fortsatt dyrkbar etter 160 dagers inkubasjon i sterilt sjøvann (Avendaño-Herrera et al., 2006). Det raske bortfallet av dyrkbare kolonier fra bakterier suspendert i ikke-sterilt vann er også rapportert fra mikrokosmeforsøk utført på de fiskepatogene bakteriene *Francisella noatunensis* og *Aeromonas salmonicida* (Duodu & Colquhoun, 2010; Stanley et al., 2002).

Det er flere metoder som brukes for å studere overlevelse i mikrokosmer og det er derfor viktig å vite begrensningene ved den enkelte metode for å hindre en mistolkning av data (Stanley et al., 2002). I en studie ble mikrokosmer brukt for å se hvorvidt resultater fra dyrkning (CFU; kolonidannende enheter), Polymerasekjedereaksjon (PCR) og Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) samsvarte med evnen *Aeromonas salmonicida* hadde til å forårsake furunkulose hos atlantisk laks (Stanley et al., 2002). PCR og ELISA-analyser ga positive resultat etter 296 dagers inkubasjon, i sterk kontrast til den faktiske dyrkbarheten av CFU som ble vist å være mindre enn et døgn. Den store diskrepansen mellom analyseresultatene understreker derfor betydning av å kjenne mulighetene og begrensningene for hver enkelt monitoreringsmetode (Stanley et al., 2002). Imidlertid har det også blitt gjort mikrokosmeforsøk der diskrepansen av analyseresultat mellom de forskjellige monitoreringsmetodene virker å være en del mindre. I et mikrokosmeforsøk der *T. maritimum* ble funnet å være dyrkbar i maksimum 5 døgn, viste PCR-analyse av vannprøver uthentet etter 10 døgns inkubasjon ingen detekterbare amplifikasjonsprodukter for bakterien (Avendaño-Herrera et al., 2006). Det er også andre begrensninger som må tas hensyn når en bruker mikrokosmer for å studere miljøoverlevelse.

Mikrokosmer er et lukket miljø, og en vil derfor ikke få et tilskudd og bortfall av næringsstoffer og avfallsstoffer slik en vil i et naturlig miljø, samtidig som den naturlige variasjonen i mikrokosmene ofte kan være mangelfull (Madetoja et al., 2003). Denne oppgaven tar for seg å studere miljøoverlevelsen til '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i mikrokosmer med ikke-sterilt vann, inkubert ved ulike temperaturer.

### 1.5 Selektiv medier

I studier av miljøoverlevelse der en nytter ubehandlet vann kan hurtigvoksende kohabiterende bakterier kamuflere vekst av studiens målorganisme. Et verktøy en kan bruke for å forhindre eller dempe vekst av uønskede bakterier er et selektivt medium.

Et selektivt medium er et vekstmedium som brukes til å isolere en spesifikk bakterie art- eller genus (Bonnet et al., 2020). Dette gjøres ved å tilføre mediumstoff som hemmer vekst av uønskede mikrober samtidig som veksten til målbakterien i mindre eller ingen grad lar seg påvirke av det tilførte stoffet. Det finnes flere forskjellige komponenter en kan tilføre et medium for å få en selektiv effekt, som for eksempel antibiotika, salter eller bakteriofager (Bonnet et al., 2020). Vanligst er å bruke antibiotika, da deres virkning ofte er godt kartlagt (Bonnet et al., 2020). Skal en eksempelvis lage et selektivt medium for å isolere en spesifikk bakterieart, vil det være hensiktsmessig å inkludere et eller flere antibiotika som virker mot både gram-positive og negative bakterier, samtidig som målbakteriearten viser resistens eller nedsatt følsomhet mot disse antibiotikaene (Bonnet et al., 2020). Ønsker en å isolere en saktevoksende bakterie vil et selektivt medium kunne brukes for å undertrykke vekst fra mer hurtigvoksende bakterier. Det finnes per i dag ingen medier som er selektive for fiskepatogene *Pasteurella*. Denne oppgaven tar for seg å kartlegge *Pasteurella* spp. sin sensitivitet for ulike antibiotika som ledd i et videre arbeid med å utvikle en selektiv agar.

### 1.6 Biofilm

Biofilm defineres som et aggregat av mikrobielle celler som er omgitt av en ekstracellulær polymer substans (EPS) matrix som er festet til en ikke levende eller levende overflate (Flemming & Wingender, 2010; Hall-Stoodley et al., 2012). EPS matrixen består hovedsakelig av polysakkarider, proteiner, nukleinsyrer og lipider, som danner et beskyttende lag rundt bakterieaggregatet. Ved å danne biofilm tilegner bakterier seg flere egenskaper som de ellers ikke ville hatt planktonisk. EPS matrixen som dannes i biofilm gir økt beskyttelse mot uttørking, UV stråling, immunforsvar, desinfeksjonsmidler, pH-endringer, oksidering og flere antibiotika (Flemming & Wingender, 2010; Jefferson, 2004). Ved at bakteriene ligger



tettpakket i EPS matrixen oppstår også tette interaksjoner gjennom celle til celle kommunikasjon og horisontal genoverføring. Faktisk er synergien mellom bakterier innad i biofilmen så sterk at det har vært diskutert hvorvidt bakterier i biofilm skal betraktes som multicellulære organismer (Shapiro, 1998).

I *Pasteurellaceae* familien er det funnet flere bakterier som har vist å danne biofilm, blant annet *Haemophilus parasuis*, *Mannheimia haemolytica* og *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Boukahil & Czuprynski, 2015; Chiers et al., 2010; Jin et al., 2006). Innenfor *Pasteurella* genuset er det derimot mindre data på artenes evne til biofilmdannelse, med unntak av *P. multocida* og *P. pneumotropica* (Olson et al., 2002; Sager et al., 2015). Dog er det sannsynlig at de fleste artene innen genuset vil kunne danne biofilm, da det generelt er bred enighet om at de fleste bakterier kan danne biofilm *in vitro* (Penesyant et al., 2021).

Det er gjort flere studier som omhandler biofilmdannelse hos fiskepatogene bakterier. I en studie av biofilmdannelse hos *Yersinia ruckeri* ble det ved analyse av bakterier inkubert i 96-brønnsmikrotiterplater funnet at økt temperatur og saltholdighet økte biofilmdannelsen for bakterien (Karlsen, 2016). I en annen studie gjort av Levipan et al. (2019) ble biofilmdannelse hos ulike stammer av den fiskepatogene *Tenacibaculum maritimum* undersøkt (Levipan et al., 2019). Det ble ikke funnet noen vesentlige forskjeller mellom stammene hva gjelder evne til å danne biofilm, men at alle stammene dannet biofilm bemerkelsesverdig hurtig (Levipan et al., 2019). Det er viktig å kartlegge bakteriers evne til biofilmdannelse, ettersom det påvirker deres virulens og overlevelsessevne. Denne oppgaven gjør et innledende studie av evne til biofilmdannelse hos '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'.

## 1.7 Bakgrunn og mål for studiet

Pasteurellose er en sykdom som forårsaker helse- og velferdsproblemer hos atlantisk laks og rognkjeks i Norge. For å gi en bedre forståelse av epizootologien til sykdommen er det behov for å kartlegge dens smittepotensiale i miljøet. Denne oppgaven har derfor som mål å studere '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' sin miljøoverlevelse ved forskjellige temperaturer. *Pasteurella*-bakterier er saktevoksende, og ved utstryk kan deres vekst ofte bli kamuflert hurtigvoksende bakterier. Det er derfor ønsket at det skal gjøres en innledende undersøkelse av antibiotikasensitivitet hos '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' med formål om å utvikle en selektiv agar. Bakterier danner biofilm som en del av deres overlevelsesstrategi, og biofilmdannelse kan være en viktig biosikkerhetsutfordring i

oppdrettsnæringen. Oppgaven har derfor som mål å gjøre en innledende studie av ‘*P. atlantica* gv. *salmonicida*’ sin evne til biofilmdannelse i ulike typer vann.

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Bakterieisolater som er brukt i studien

Tabell 2.1: Viser de forskjellige bakteriestammer nyttet i studien med tilhørende frysenummer, artsopprinnelse, organ og geografisk opprinnelse.

Bakteriearter	Frysenummer	Opprinnelse (Fisketype)	Organ	Geografisk opprinnelse (fylke)
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	NCIMB-1102			
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 17620			
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCUG 17621			
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	50-3624 / VIO 11639	Laks	Ukjent	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	50-3131	Laks	Ukjent	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	50-3694 / VIO 8239	Laks	Øye	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	50-3690 / VIO 2257			Troms og Finnmark
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	VIB 3763	Laks	Nyre	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	VIB 3708	Laks	Hjerte	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	VIB 3687	Laks	Nyre	Møre og Romsdal
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	VIB 3308	Laks	Ukjent	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	VIB 3642	Laks	Ukjent	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	VIB 3672	Laks	Nyre	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>salmonicida</i> ’	50-2635	Laks	Ukjent	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ’	VIB-5284 / VIO 9100	Rognkjeks	Ukjent	Møre og Romsdal
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ’	50-164	Rognkjeks	Ukjent	Rogaland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ’	50-1365	Rognkjeks	Sår	Vestland
‘ <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> ’	50-3004	Rognkjeks	Ukjent	Vestland

' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	VIB 3801	Rognkjeks	Nyre	Troms og Finnmark
' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	VIB 3802 /VIO 9084	Rognkjeks	Nyre	Nordland
' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	50-1926	Rognkjeks	Nyre	Vestland
' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	50-2702	Rognkjeks	Nyre	Vestland
' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	50-543	Rognkjeks	Ukjent	Rogaland
' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	50-2993	Rognkjeks	Nyre	Vestland
' <i>Pasteurella atlantica</i> gv. <i>cyclopteri</i> '	VIB 4016 / VIO 3648	Rognkjeks	Nyre	Troms og Finnmark
<i>Pasteurella skyensis</i>	VIB 3645	Ukjent	Ukjent	UK

CCUG: Culture collection, University of Göteborg

NCIMB: National Collection of Marine and Industrial Bacteria, Aberdeen

## 2.2 Oppdyrking og forkultur i vekstmedium

'*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) lagret på frysebuljong med ca 20% glyserol ble dyrket opp fra frys som holdt -80 °C. Bakteriene ble dyrket på BAS skål og satt til inkubasjon ved 22 °C i minimum to døgn. For å bekrefte at veksten var ønsket art ble det nyttet MALDI-TOF (se avsnitt 2.5).

Isolatet ble dyrket på Tryptic Soy Broth (TSBSS). Syv ml volumer av TSBSS ble deretter inokulert med en full 10 µl podeøse og inkubert på 22 °C (115 RPM; Compact Digital Mini Rotator Thermo Fisher)

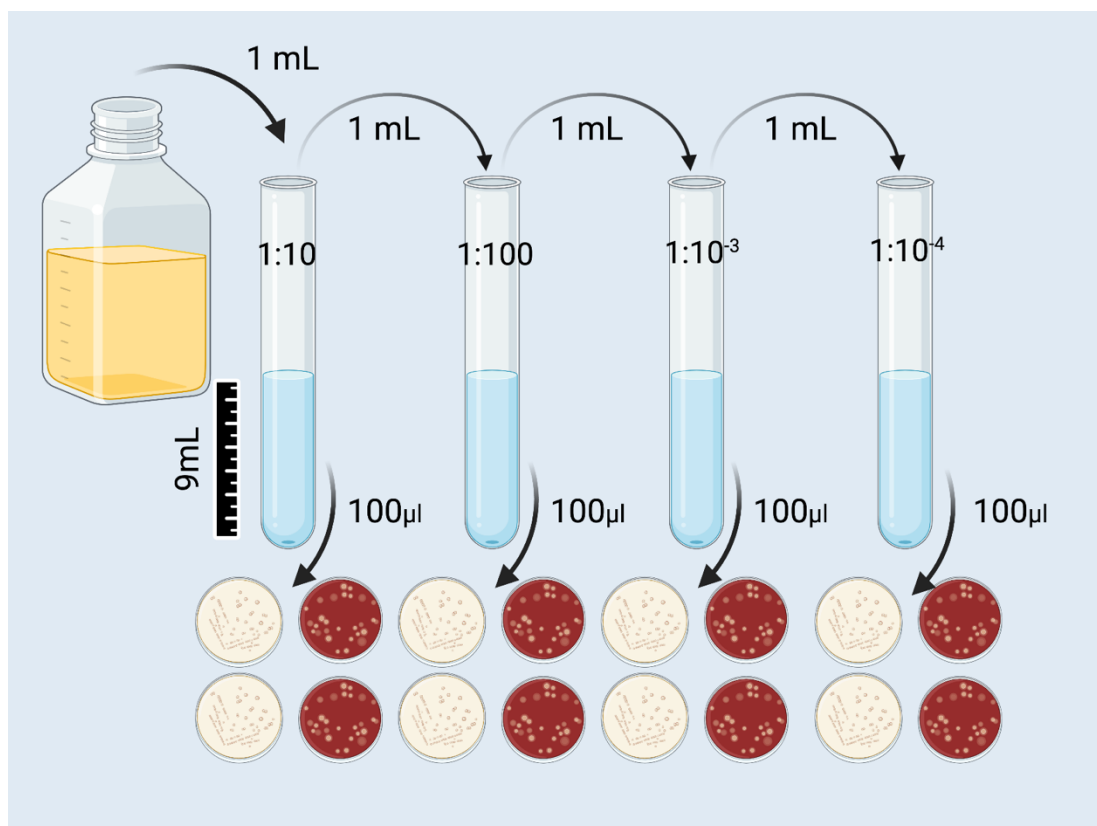
## 2.3 Måling av optisk tetthet (OD)

For å monitorere vekstdynamikk i sanntid ble det gjennomført spektrofotometriske (Genesis 10S spectrophotometer, ThermoFischer) målinger av bakteriekulturer inokulert i TSBSS. Målingene ble gjort ved 600 nanometer (nm). OD-målingene ble gjennomført ved å pipettere 1 ml fra TSBSS-kulturen til plastkvetter som ble målt spektrofotometrisk. Som blank prøve i forsøket ble det nyttet 1 ml TSBSS uten bakterietilsetninger.

## 2.4 Undersøkelse av dyrkbar tetthet ved bruk av fortynningsrekke

I forsøket ble det laget tifoldstynningsrekker som ble strøket ut på skål med formål om å undersøke den dyrkbare tettheten i prøvekulturer (eksempelvis TSBSS eller mikrokosmer). Det ble laget til ni rør der hvert av rørene inneholdt 9 ml destillert 3,3 % NaCl vann. Til det første røret ble det tilført og innblandet 1 ml fra prøvekulturen. Videre ble det pipetert og blandet 1 ml fra rør til rør slik at en fikk dannet en fortynningsgradient som gikk fra 1:10 til 1:10<sup>9</sup> (se figur 2.1). Fra hvert av rørene ble det overført 100 µl som ble strøket ut på skål ved bruk av en L-formet podøse og satt til inkubasjon. Etter inkubasjon ble det telt antall kolonidannendeenheter (CFU; Colony-forming unit) på hver skål. Ved bruke bruke formel (1) kan en ved utregning anslå den dyrkbare tettheten i prøvekulturen. Prøvekultur, inkubasjonstid, agartype og antall var ulik mellom forsøkene og står derfor beskrevet i hvert enkelt forsøk.

$$\text{Formel (1): CFU pr mL} = \frac{\text{antall CFU på agarskål} \times \text{total fortynningsfaktor}}{\text{Volum strøket ut på agarskål}}$$



Figur 2.1: Viser et eksempel oppsett på fortynningsrekke med utstryk på duplikater av BAS og MA skåler.

## 2.5 MALDI-TOF MS

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) nytter massespektrometri for å gi en hurtig identifisering av mikroorganismer (Wieser et al., 2012). En enkelt bakteriekoloni ble overført fra skål til en nummerert metallplate med totalt 96 designerte felt. I tillegg til prøvemateriale fra de ukjente bakteriekoloniene ble platen tilført referanse isolater av *Escherichia coli* (CCUG 17620) og *Staphylococcus aureus* (CCUG 17621) for kontroll av analysen. Mengden som ble overført til metallplaten tilsvarer omtrentlig ett fyrstikkhode. På metallplaten ble det pipettert 1 µl matrix over bakteriene. Matrixen inneholder syre som krystalliserer med prøvene (Wieser et al., 2012). Metallplaten ble så satt til tørking til prøvene fremsto som helt tørr. Platen ble videre overført til instrumentet, der metallplaten lades inn i ett vakuumkammer. I kammeret beskytes prøvemateriale med en pulserende laser som fører til ionisering av prøvematerialet. Disse ionene akselerer i et elektrisk felt før de vandrer inn i en vakuumtube. På toppen av vakuumtuben er en detektor som registrerer tiden ionene bruker på vandringen gjennom tuben. Hvor fort ionene vandrer i vakuum avhenger av ladningen og massen avgjør hastigheten ionet får i vakuum (Wieser et al., 2012). Maskinen sammenligner så vandringstiden fra hver laserbeskytning opp mot en database som inneholder artsspesifikke data. Etter at analysen er fullført, fikk en automatisk dannet rapport der det oppgis artsnavn og en score for hver analyserte prøve. En score over 2.0 ansees som ett sikkert treff på artsnivå mens en score i område mellom 1.7 og 2.0 ansees som et sikkert treff på genusnivå (Wieser et al., 2012). Alt under 1.7 oppgis som ingen resultat.

## 2.6 Undersøkelse av vekstdynamikk for '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*', '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' og *Pasteurella skyensis* i TSBSS ved måling av optisk tetthet

Det ble gjennomført måling av optisk tetthet (OD) på isolater av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) inokulert i TSBSS med formål om å kartlegge vekstdynamikk.

Isolatene ble dyrket opp og inokulert på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.2. Videre ble 5 ml av bakteriekulturen inokulert på 100 ml TSBSS og satt til resting (115 RPM; Compact Digital Mini Rotator Thermo Fisher). Celletettheten i TSBSS kulturene ble målt spektrofotometrisk (Genesis 10S spectrophotometer, ThermoFischer) ved 600 nm (se avsnitt 2.3). I løpet av de 32 timer forsøket vedvarte ble det gjennomført totalt 8 OD målinger for

'*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' og *Pasteurella skyensis* kulturene, mens det for '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' ble gjennomført 5 OD målinger.

### 2.7 Gramfarging av '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' i TSBSS

Det ble gjennomført gramfarging av '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' som var inokulert i TSBSS kultur, med formål om å undersøke om det var intakte bakterier tilstede i prøven.

TSBSS-kulturen ble ristet forsiktig og en dråpe av kulturen ble pipettert over til et objektglass, som ble lufttørket. Baksiden av objektglasset ble til slutt ført gjennom flammen fra en gassbrenner for videre tørking av preparatet.

Det tørkede preparatet ble farget med Bacto Gram Crystal Violet i ett minutt, deretter skyllet i vann. Så ble det tilført Bacto Gram Lodine, som også ble vasket vekk etter 1 minutt. Videre ble preparatet tilført Bacto Gram Decolourizer, helt til væsken som rant fra preparatet var fargeløs. Til slutt ble Bacto Gram Safranin tilført preparatet, preparatet ble vasket med springvann og så satt til tørking. Det gramfargede preparatet ble studert i et lysmikroskop (Labophot, Nikon), med bruk av oljeimmersjonsobjektiv.

### 2.8 Vekstforsøk 1 og 2: Vekstdynamikk undersøkt ved måling av OD, CFU og Ct-verdi for '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i TSBSS

Det ble gjennomført et vekstforsøk med formål å kartlegge korrelasjonen mellom optisk tetthet (OD), kolonidannende enheter (CFU) og cycle threshold (Ct) verdi.

Fra frys som holder -80 °C ble det dyrket opp '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) på en BAS skål som ble inkubert ved 22 °C i 2 døgn. Etter inkubasjon ble bakteriene slemmet opp i TSBSS og satt til risting (115 RPM; Compact Digital Mini Rotator Thermo Fisher)

Etter 23 timers inkubasjon ble det foretatt en måling av OD (Se avsnitt 2.3). Videre ble det laget en fortynningsrekke som ble strøket ut på BAS som ble satt til inkubasjon i 22 °C (se avsnitt 2.4).

Det ble så pipettert 5 ml fra bakteriekulturen over i en flaske med kork som inneholdt 100 ml TSBSS. Denne ble satt til inkubasjon med risting på 115 RPM i romtemperatur (Compact Digital Mini Rotator, Thermo Fisher). Fra 105 ml TSBSS-kulturen ble det så tatt ut følgende prøver hver 5. time inntil kulturen nådde platånivå, avgjort ved måling av OD:

- 1 ml til måling av OD (Se avsnitt 2.3)

- 1 ml til fortynningsrekke og telling av CFU (Se avsnitt 2.8.1)
- 1 ml for ekstraksjon av DNA (se avsnitt 2.8.2) og påfølgende qPCR-analyse for Ct-verdi (Se avsnitt 2.11).

Forsøket ble i sin helhet gjennomført 2 ganger for å kartlegge eventuelle variasjoner i resultater.

### 2.8.1 Fortynningsrekke for bestemmelse av kolonidannende enheter

Det ble gjennomført en tifoldsfortynningsrekke for å bestemme kolonidannende enheter i TSBSS kultur. Formålet var å korrelere verdier fra OD målinger til faktisk tetthet av dyrkbare bakterier ved seriefortynning og telling av kolonier. Fortynningsrekken ble gjennomført på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.4. Hver av fortynningsgradientene ble spredt ut på BAS skåler og inkubert ved 22 °C i 3 døgn. Etter inkubasjon ble det gjennomført en telling av CFU. Om antallet CFU overskred 300 ble det loggført som «overvekst». Det ble tatt ut isolater til MALDI-TOF analyse (se avsnitt 2.5) for å bekrefte at veksten var av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624). Formel (1) ble benyttet for utregning av tettheten dyrkbarekolonier / ml i TSBSS kulturen (se avsnitt 2.4).

### 2.8.2 DNA ekstraksjon fra bakteriekultur for qPCR-analyse

Det ble gjennomført en DNA ekstraksjon av prøvematerialer innhentet i vekstforsøk 1 og 2 (se avsnitt 2.8) med formål om å gjennomføre en qPCR analyse (Se avsnitt 2.11) for å undersøke hvordan Ct-verdier korrelerer med CFU og OD målinger.

DNA ekstraksjon og rensing av bakteriekultur fra det innledende vekstforsøket ble gjennomført ved å bruke High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Metoden ble utført i henhold til protokollen som medfølger kittet.

Først ble det pipettert 1 ml fra 100ml flasken til et 1,5 ml eppendorf rør som ble sentrifugert (miniSpin eppendorf sentrifuge) i 5 minutter ved 6000 g. Etter sentrifugering ble all væske forsiktig pipettert vekk slik at bare bakteriepelleten lå igjen. Pelleten ble satt til å tørke i romtemperatur i 5 minutter før den ble tilført 200 µl PBS og lagret i frys som holdt -20 °C for videre isolering av DNA.

Den videre ekstraksjonsprosessen baserer seg på en stegvis metodikk, der en først lyserer cellene ved å tilføre lysisbuffer, Protinase K og isopropanol i tillegg til en ti minutters inkubasjon ved 70 °C. I det neste steget blir prøvene overført til kolonner som sentrifugeres i ett minutt ved 8000 g, med formål om å binde nukleinsyrer til glassfiberfilamentene i filteret til kolonnen. Videre følger en vaskeprosess der det blir tilført ulike vaskebuffer som trinnvis ble

sentrifugert gjennom filteret med formål om å fjerne eventuelle urenheter. Til slutt blir DNAet eluert ved å tilføre kolonnen en elueringsbuffer. Prøvene ble målt for DNA konsentrasjon og renhet (se avsnitt 2.10) før de ble lagret i frys som holdt -20 °C for videre arbeid.

## 2.9 Miljøoverlevelse i mikrokosmer

Miljøoverlevelse til '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ble studert i mikrokosmer som ble inkubert ved henholdsvis 4, 10 og 15 °C. Denne tilnærmingen muliggjør studier av overlevelse i naturlig sjøvann under forholdvis kontrollerte omstendigheter. Forsøket ble gjort over en tidsperiode på 19 dager. I løpet av forsøksperioden ble det jevnlig tatt ut vannprøver til dyrkning (avsnitt 2.9.1) og til qPCR-analyse (avsnitt 2.11).

Ufiltrert og ubehandlet sjøvann ble hentet fra sjøvannsinntaket til Havforskningsinstituttet i Bergen som har vanninntak på 127 meters dyp i byfjorden i Bergen. I forsøket ble det nyttet en liters flasker i glass med skrukork, og til hver av flaskene ble det tappet 1 liter sjøvann.

Det ble dyrket opp '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) på BAS skål, som ble slemmet opp i TSBSS (se avsnitt 2.2). Vekstkulturen ble målt for OD (Se avsnitt 2.3) og 5 ml av kulturen ble overført til en flaske med 100 ml TSBSS som ble satt på risting ved 115 RPM (Compact Digital Mini Rotator, Thermo Fisher) i romtemperatur med løs tilskrudd kork. Etter 23 timer ble kulturen målt for OD (Se avsnitt 2.3) og det ble gjort en tifoldsfortynningsrekke for CFU bestemmelse (Se avsnitt 2.9.1).

I vekstforsøk 1 og 2 (se avsnitt 2.8) ble det sett en korrelasjon mellom CFU og OD for vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i TSBSS (se avsnitt 3.2). Ved å bruke disse resultatene kunne en ved OD måling gjøre et anslag i sanntid for den dyrkbare tettheten pr ml i TSBSS kulturen. Det var ønsket at hver mikrokosme skulle ha en dyrkbar tetthet på 1 million CFU/ml med '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ved starten av forsøket. Mengden som ble tatt ut fra TSBSS kulturen og tilført hver enkelt mikrokosme ble derfor utregnet ved å se OD måling av TSBSS kulturen opp mot resultatene fra vekstforsøk 1 og 2 (se avsnitt 2.8). Mengden TSBSS kultur som ble tilsatt i mikrokosmene er fremvist i tabell 3.2.

Det ble gjennomført en vaskeprosess av TSBSS kulturen før den ble tilsatt mikrokosmene. Vaskeprosessen ble gjennomført ved å overføre kulturen til eppendorfrør som ble spunnet ned ved 6000 g i 5 minutter (Minispin, Eppendorf) slik at det ble dannet en bakteriepellet i bunn av eppendorfrøret. All væske ble så pipettert forsiktig vekk slik at bare pelleten lå igjen. Det ble



så tilført 1,5 ml destillert 3,3 % NaCl saltvann. Vaskeprosessen ble gjentatt 3 ganger slik at minst mulig av TSBSS vekstmediumet ble overført til mikrokosmene. Til slutt ble det pipettert 1 ml vann fra mikrokosmen og til eppendorfrøret der bakteriepelleten ble løst i vannet ved forsiktig pipettering opp og ned. Det bakterieholdige vannet ble tilført mikrokosmen og blandet ved forsiktig risting av mikrokosmen.

Mikrokosmene ble dekket med aluminiumsfolie for å hindre tilgang på lys. Videre ble de satt med korken løst tilskrudd inn i inkubator. Mikrokosmene som var på inkubasjon ved 10 og 15 °C var plassert i en Infors HT Minitron Inucabor Shaker med risting på 200 RPM. For mikrokosmene inkubert ved 4 °C ble det nyttet en kjøleinkubator (MIR-154-PE, Panasonic) med magnetisk rører (Multipoint HP, Variomag) satt til 200 RPM i omrøringshastighet.

For å undersøke miljøoverlevelsen til '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ble det fra hver mikrokosme tatt ut 1 ml til fortynningsrekke for telling av CFU (se avsnitt 2.9.1) og 1 ml til qPCR analyse. Oversikt over hvilke tidspunkter det ble tatt ut prøver fra mikrokosmene er fremvist i tabell 2.2.

Tabell 2.2: Viser mikrokosmer delt inn etter inkubasjonstemperatur og tid i døgn for prøvetaking. Fortynningsrekke («CFU-bestemmelse» i graf) ga utstryk på 2 blodagar med salt skåler og 2 marineagar. «qPCR» viser at det ble tatt ut vannprøver for filtrering vha peristaltisk pumpe.

Tid i døgn	Inkubatortemperatur		
	4°C	10°C	15°C
0	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse
	qPCR	qPCR	qPCR
2	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse
	qPCR	qPCR	qPCR
4			CFU-bestemmelse
			qPCR
5	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse	
	qPCR	qPCR	
7	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse
	qPCR	qPCR	qPCR
9	CFU-bestemmelse	CFU-bestemmelse	
	qPCR	qPCR	qPCR
14			
	qPCR	qPCR	qPCR
19			
	qPCR	qPCR	

### 2.9.1 Kartlegging av dyrkbar tetthet og diversitet i mikrokosmene

Det ble gjennomført CFU basert bestandsestimering ved fortynningsrekke (avsnitt 2.4) og utstryk på BAS og MA skåler for å undersøke vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) og kartlegge diversiteten av artene tilstede i mikrokosmene. Fra hver mikrokosme ble det tatt ut 1 ml vann på dagene markert med «CFU-bestemmelse» i tabell 2.2. Det ble gjort en fortynningsrekke (se avsnitt 2.4) som ga utstryk på duplikater av MA og BAS skåler. Disse ble inkubert i romtemperatur som varierte mellom 19,3 og 21,0 °C.

Etter 6 dagers inkubasjon ble det gjennomført telling av CFU. Antall CFU for hver skål ble registrert og skåler som hadde et antall CFU som overskred 300 ble notert som «overvekst».

Det ble tatt ut isolater fra skåler der en hadde vekst av kolonier som var fenotypisk forenlig med '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (se avsnitt 1.3.6). På disse koloniene ble det gjennomført MALDI-TOF analyse (se avsnitt 2.5) for å bekrefte en eventuell vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624). Det ble også gjennomført MALDI-TOF analyser på kolonityper som basert på fenotype *ikke* var forenelig med '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. Dette ble gjort med formål om å kartlegge diversiteten av arter til stede i mikrokosmene.

### 2.9.2 Filtrering av vannprøver ved bruk av nitrocellulosefilter.

Med formål om å gjennomføre qPCR-analyse ble det tatt ut 1 ml vannprøver fra hver mikrokosme til filtrering. Av tabell 2.2 kan en se tidspunkter for uttak av vannprøver fra mikrokosmene. Vannet ble filtrert ved bruk av en peristaltisk pumpe (Shenchen V6-3L) med Thermo Scientific Analytical Test Filter Funnel med 0.45 micron filter 250ml. Filterkoppene ble gjenbrukt, men filtrene ble byttet mellom hver filtrering med bruk av sterile engangspinsetter. Filtrene som ble byttet mellom hver prøve var MF-Millipore Membrane Filter 0.45 µm 47mm (Millipore). Pumpetrykket var satt til 900 ml i minuttet og prøvene ble filtrert inntil alt vann var passert gjennom filteret. Etter filtrering ble filtrene overført til 5 ml eppendorfør og lagret ved -20 °C inntil videre bearbeiding.

### 2.9.3 DNA-ekstraksjon fra nitrocellulosefilter

DNA ekstraksjon fra nitrocellulosefilter ble gjort med formål om å bruke qPCR til å undersøke variasjon i Ct-verdi over tid for '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' og sammenligne disse med resultater fra dyrkning (avsnitt 2.9.1).

DNA ekstraksjon fra nitrocellulose filter ble utført ved å bruke en modifisert protokoll som baserer seg på DNeasy blood & tissue kit Qiagen report og tidligere publisert ekstraksjonsprotokoll (Spens J et al., 2016).

Etter filtrering av vannprøver (se avsnitt 2.9.2) ble de filtratholdige nitrocellulosefilterne frosset ned i 5 ml eppendorf rør ved -20 °C (DNA LoBind Tubes 5.0 ml, eppendorf) inntil videre prosessering. Hvert av rørene fikk så tilsatt 720 µl ATL tissue lysis buffer og 80 µl protinase K. Rørene ble vortexet i 15 sekunder før de ble satt til inkubering ved 56 °C med resting på 200 RPM. Etter 24 timers inkubering ble rørene vortexet før all væsken ble målt og pipettert over i nye 5ml Lobind rør. Til hvert av Lobind rørene ble det tilsatt AL buffer og iskald etanol i et 1:1:1 forhold. Videre ble 650 µl av lysatet pipettert over til en DNeasy Mini spin kolonne og sentrifugert i 1 minutt ved 6000 g. Videre ble det tilsatt 500 µl AW1 vaskebuffer til hver av kolonnene som ble sentrifugert ved 6000 g i 1 minutt. Etter dette ble AW2 vaskebuffer tilsatt og sentrifugert ved 6000 g i 1 minutt. Videre ble kolonnene plassert i et nytt oppsamlingsrør sentrifugert på maks hastighet (16 100 g, miniSpin eppendorf) i 4 minutter for å tørke kolonnen. Etter tørking ble kolonnen overført til et nytt 1,5 LoBind eppendorf oppsamlingsrør og tilsatt 100 µl AE fortynningsbuffer som ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Etter inkubering ble prøvene sentrifugert ved 1000 g i ett minutt. Til slutt ble kolonnene kastet og prøvene ble målt for renhet og konsentrasjon (Se avsnitt 2.10). Etter måling ble prøvene lagret i frys som holdt -20 °C for videre arbeid.

### 2.9.4 Undersøkelse av veksthemming fra miljøbakterier i mikrokosmer evner til å hemme vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'

I mikrokosme-forsøket (avsnitt 2.9) ble det etter utstryk for CFU bestemmelse funnet vekst av bakteriearter som ikke var *Pasteurella* sp. Det var derfor ønsket å undersøke hvorvidt andre bakteriearter hadde en antagonistisk virkning på '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'.

'*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ble dyrket opp og strøket ut på agarskål på for å få teppevekst, på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.12. Videre ble det valgt ut totalt 18 bakterieisolater fra utstryk av fortynningsrekke i mikrokosmeforsøket (avsnitt 2.9.1). Disse

ble valgt ut basert på at de tilsynelatende var ulike i kolonimorfologi. Fra hver koloni ble det ved bruk av en steril podøse forsiktig tatt ut bakterier av en mengde tilsvarende av størrelse omtrentlig et fyrstikkhode og podet ned på blodagar med 2% NaCl skål som hadde blitt sådd ut med teppevekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. Agarskålene ble så satt til inkubasjon i 3 døgn på 22 °C.

Etter inkubasjon ble skålene undersøkt for eventuell hemming av vekst. Her ble et skyvelære nyttet for å kartlegge eventuelle veksthemmingssoner rundt de tilførte bakteriekoloniene.



Figur 2.2: Illustrerer forsøket som ble satt opp, med vekst av bakteriekoloni 16, 17 og 18 på en BAS skål med teppevekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624).

### 2.10 Måling av templat DNA for konsentrasjon og renhet

Templat DNA ble målt med formål om å fastsette konsentrasjon (ng/ $\mu$ l) og renhet (Abs 260/280). Målingen ble gjort ved bruk av et spektrofotometer (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Målingen ble gjennomført i henhold til NanoDrop 2000/2000C Spectrophotometer V1.0 User manual.

### 2.11 Real time qPCR analyse

Det ble gjennomført sanntids kvantitativ polymerase kjedereaksjons (qPCR) analyse i vekstforsøk 1 og 2 (avsnitt 2.8) og mikrokosmeforsøket (avsnitt 2.9). Formålet med qPCR analysen var å korrelere Ct-verdier opp mot antall CFU og OD-målinger. Videre var det for mikrokosmeforsøket viktig å undersøke endringen i '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) genomekvivalenter over tid.

Ved qPCR-analyser kan en følge akkumulasjonen av amplifiseringsprodukter fra hver syklus i sanntid. Dette muliggjøres ved at proben er festet til fluorescensmolekyler som frigjøres når proben binder til målsekvensen sin. I løpet av en qPCR-analyse foregår det stegvise sykluser, der temperaturen heves og senkes. For hver syklus som gjennomføres vil det skje en dobling av PCR produkter. Som følge av fluorescensmolekylet tilfestet proben vil en derfor for hver syklus kunne observere en tilsvarende økning i fluorescens om målsekvensen er til stede i prøven. Ved å måle økningen i fluorescens får en dannet en amplifikasjonskurve. Av kurven fastsetter en terskelverdi som fungerer som et grensesnitt for bakgrunnsfluorescensen tilstede i analysen. Antallet sykluser som behøves for å produsere nok amplifisert produkt til at fluorescensen overstiger terskelverdien fastsettes som syklisk terskelverdi (Ct-verdi). En vil derfor få lave Ct-verdier om det er mye måltemplat til stede i prøven, høye verdier om det er lite eller ingen Ct-verdi om det ikke registreres nok amplifisert produkt til å overstige terskelverdien.

Til qPCR-analyse ble det på forhånd laget til en mastermix (se tabell 2.3) der 19 µl ble tilsatt hver brønn. Videre ble det tilsatt og innblandet 1 µl templat DNA. I tillegg til å prøvebrønnene ble det nyttet 1 brønn til negativ kontroll (NK) der 1 µl nukleasefritt vann subsidierte templatet. Det ble også inkludert 3 brønner for positiv kontroll (PTK). Disse var fortynnet i forholdene 1/10, 1/100 og 1/1000 og templat fra et kjent isolat av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ble nyttet.

Tabell 2.3: Viser komponenter til stede i mastermixen i tillegg til å vise mengde templat DNA og totalt volum tilsatt hver brønn. Volumene fremvist i tabell er tilsvarende en analyse.

Komponent	Opprinnelig kons.	Kons. i reaksjonsmiks	Volum (µl)
Nucleasefritt vann			4,2
Brilliant III Ultra-Fast Q-PCR Master Mix	2x		10
Primer Forward	10 uM	900nM	1,8
Primer Reverse	10 uM	900nM	1,8
Patlsalm_BHQprobe	5uM	600nM	1,2
Templat DNA			1
Totalt prøvevolum			20

qPCR analysen ble gjennomført ved å bruke en real-time-per Stratagene Mx3005P QPCR Systems maskin (Agilent Technologies). PCR programmet som ble nyttet bestod av 15

minutters dekontaminering ved 50 °C og to minutters aktivering av polymerase og denaturering av templat ved 95 °C. Videre ble det gjennomført 40 sykluser bestående av denaturering i 5 sekunder ved 95 °C og en tilhørende forlenging ved 57 °C i 45 sekunder. Total analysetid var 1 time 24 minutter og 29 sekunder.

Tabell 2.4: Viser forward og reverse primere og prober nyttet i qPCR-analysen.

Assay	Primer	Primersekvens	Referanse
Probe		FAM- ACTTGATGAAGCTACACAACGTG-BHQ-1	(Sandlund et al., 2021)
Forward		TCTAATATTGATGATCTTGTTTG	(Sandlund et al., 2021)
Reverse		ATTCCTAAATTAGGAAAGATAC	(Sandlund et al., 2021)

## 2.12 Resistensundersøkelse av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*', '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' og *P. skyensis* ved bruk av agardiffusjonstesting

Som et begynnende ledd i et videre arbeid med å utvikle en selektiv agar ble forskjellige stammer av *Pasteurella skyensis*, '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' og '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (tabell 2.5) undersøkt for deres følsomhet for en rekke ulike antibiotika.

Kjente bakterieisolater av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *P. skyensis* (VIB 3645), *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (NCIMB-1102) og *Staphylococcus aureus* (CCUG 17621) ble dyrket opp fra frys. *Pasteurella* isolatene ble dyrket opp på BAS og inkubert ved 22 °C i 3 døgn. Referanseisolatene *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (NCIMB-1102) og *Staphylococcus aureus* (CCUG 17621) ble dyrket på blodagar (BA) og inkubert på henholdsvis 22 °C og 37 °C som kontrollorganismer i forsøket.

For å ha kontroll på mengden bakterier som ble tilført agarskålen ble det benyttet et densitometer (DEN-1, Biosan Ltd). Bakteriene ble løst i 5ml fysiologisk saltvann 0,9 % NaCl og tilførselen av bakterier skulle utgjøre en turbiditet tilsvarende på 0,5 McFarland standard i prøven (Dalynn Biologicals et al., 2014). Dette ble oppnådd ved å enten fortenne eller tilføre mer bakterier til suspensjonen. Videre ble prøven strøket ut på agarskål ved bruk av en bomullspinne og en rotator. Skålene ble så satt til å tørke i romtemperatur i 10 minutter. Antibiotika lapper (Oxoid) ble plassert ut ved bruk av en dispenser og skålene ble inkubert i 3 døgn i romtemperatur. Størrelsen på resistenssonene ble avlest ved bruk av et skyvelære og diameter av sonestørrelse ble loggført i Excel.

Tabell 2.5: Viser de forskjellige antibiotika som ble nyttet i sensitivitetstesting av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* (VIB 3624), *Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri* (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) med tilhørende antibiotikakode, katalognummer og konsentrasjon.

Antibiotika	Antibiotikakode	Katalognummer (Oxoid)	Konsentrasjon (µg)
Ampicillin	AMP2	CT0002B	2
Neomycin	N30	CT0033B	30
Chloramphenicol	C30	CT0013B	30
Pencillin G	P1	CT0152B	1 unit
Amoxicillin clavulanic acid 2:1	AMC30	CT0223B	30
Cefotaxime	CTX5	CT0407B	5
Clindamycin	DA2	CT0064B	2
Tobramycin	TOB10	CT0056B	10
Sulphamethoxazole/trimethoprim	SXT25	CT0052B	25
Nitrofurantoin	F100	CT0034B	100
Fusidic acid	FD10	CT0023B	10
Erythromycin	E15	CT0020B	15
Tetracycline	TE30	CT0054B	30
Cefoxitin	FOX30	CT0119B	30
Nalidixic acid	NA30	CT0031B	30
Polymyxin B	PB300	CT0044B	300 units
Oxacillin	OX1	CT0159B	1
Florfenicol	FFC30	CT1754B	30
Ceftazidime	CAZ10	CT1629B	10
Ciprofloxacin	CIP5	CT0425B	5
Gentamicin	CN10	CT0024B	10
Meropenem	MEM10	CT0774B	10
Trimethoprim	W5	CT0076B	5
Ampicillin	AMP10	CT0003B	10
Cephalexin	CL30	CT0007B	30

### 2.12.1 Sensitivitetsvariasjoner mellom intrataksomiske grupper for utvalgte antibiotika

Etter å ha sensitivitetstestet enkelte isolater av *Pasteurella skyensis* (VIB 3645), *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* (VIB 3624) og *Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri* (VIB 5284) for en rekke forskjellige antibiotika ble variasjonen i sensitivitet innad i de forskjellige taksonomiske gruppene av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* og *Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri* undersøkt. Totalt ble det gjennomført diffusjonstesting av 11 stammer av *P.*

*atlantica* gv. *salmonicida*’ og 11 stammer av ‘*P. atlantica* gv. *cyclopteri*’ for de antibiotika som fremvises i tabell 2.6.

Metode for dyrkning og sensitivitetstesting ble utført på samme måte som i forsøk 2.12. For å undersøke eventuelle variasjoner i sensitivitet ble det valgt ut 12 forskjellige antibiotika (Tabell 2.6). Disse ble valgt på bakgrunn av deres observerte resistens i forsøk 2.12. I tillegg ble det vektet at det skulle være en variasjon i antibiotikumets virkemåte, slik at en ikke bare inkluderte eksempelvis antibiotika som virker mot gram-negative bakterier.

Tabell 2.6: Viser de forskjellige antibiotikum nyttet i sensitivitetstesting av ‘*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*’ (VIB 3624) og ‘*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*’ (VIB 5284) med tilhørende antibiotikakode, katalognummer og konsentrasjon.

Antibiotika	Antibiotikakode	Katalognummer (Oxoid)	Konsentrasjon (µg)
Neomycin	N30	CT0033B	30
Clindamycin	DA2	CT0064B	2
Tobramycin	TOB10	CT0056B	10
Sulphamethoxazole/trimethoprim	SXT25	CT0052B	25
Oxacillin	OX1	CT0159B	1
Gentamicin	CN10	CT0024B	10
Meropenem	MEM10	CT0774B	10
Trimethoprim	W5	CT0076B	5
Ampicillin	AMP10	CT0003B	10
Fusidic acid	FD10	CT0023B	10
Erythromycin	E15	CT0020B	15
Ceftazidime	CAZ10	CT1629B	10

### 2.13 Studie av biofilmdannelse for ‘*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*’ i ulike typer sjøvann

Forsøket ble utført med formål om å avdekke hvorvidt ‘*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*’ (VIB 3624) evner å danne biofilm. Dette ble utført ved å bruke 96-brønnsmikrotiterplater (Thermo Scientific, Nunclon delta Surface) der oppdyrket ‘*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*’ ble tilsatt forskjellige typer vann og så inkubert, farget og målt for optisk tetthet (OD). Metoden for forsøket er som tidligere publisert med unntak av forkultur, blandeforhold og inkubasjonstid (Vestby et al., 2009).



Oppdyrking og laging av forkultur i TSBSS ble gjort på samme måte som beskrevet under avsnitt 2.2 og forkultur ble satt til risting ved 115 RPM i romtemperatur (Compact Digital Mini Rotator, Thermo Fisher). Etter 23 timers inkubasjon ble bakterietettheten målt for OD (avsnitt 2.3). Til hver av brønnene på platen ble det tilført 150 µl romtemperert vann. I forsøket ble det testet for to ulike typer vann: filtrert og autoklavert sjøvann fra Oslofjorden, kunstig sjøvann 33 ‰ sjøsalter. I kontrollbrønnene ble det tilsatt 25 µl TSBSS. I hver av de resterende brønnene ble det tilsatt 25 µl av forkulturen. Mikrotiterplatene ble så satt til inkubasjon ved 22 °C i 7 døgn. På dag 3 og 6 ble det gjort utstryk fra tilfeldige brønner på BAS skåler for å undersøke overlevelse, eventuelle kontaminanter og bekrefte vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ved MALDI-TOF analyse (avsnitt 2.5). Etter inkubasjon ble platene avlest i en plateleser (BioTek, EL800) ved 595 nm. Videre ble brønnene tømt og slått mot benkeplaten. Etter dette ble brønnene vasket en gang med 200 µl 3,3% NaCl vann. Det ble så tilsatt 200 µl krystall-fiolett 1% til hver av brønnene og platene ble satt til inkubasjon i 30 minutter i romtemperatur. Etter inkubasjon ble platene vasket 4 ganger på samme måte som tidligere beskrevet, inntil alt overskudd av krystallfiolett var fjernet fra brønnene. For å løse biofilmen ble det tilført 200 µl etanolaceton (70% etanol og 30% aceton) til hver brønn, før platen ble satt til inkubering i 15 minutter i romtemperatur. Platene ble så satt i plateleser (BioTek, EL800) og avlest på samme måte som tidligere beskrevet.

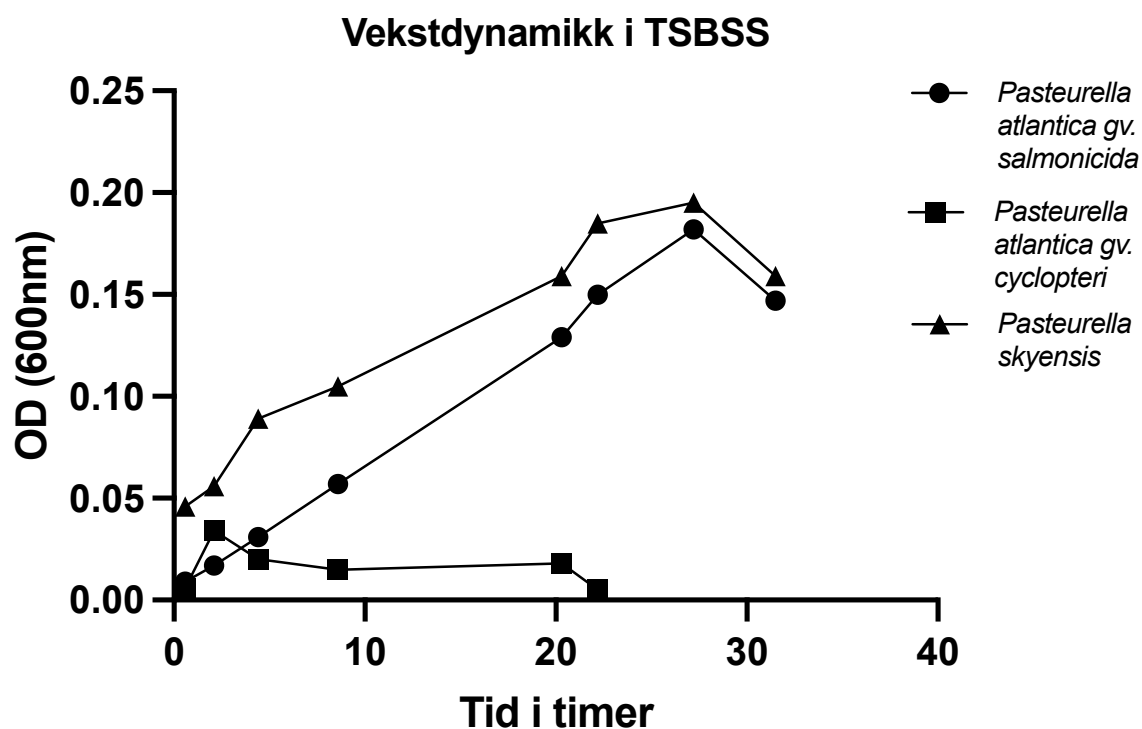
Data fra avlesning ble overført til Microsoft Excel der målingene fra prøvebrønnene ble sammenlignet mot kontrollbrønnene. Det ble gjort en medianberegning av prøvebrønner og kontrollbrønner. Metoden for tolkning av resultater baserer seg på å sammenligne absorbansmålinger av kontrollbrønner opp mot prøvebrønner etter farging og vasking. Hvis absorbansmålinger av prøvebrønnene gir en høyere medianverdi enn den fra de korresponderende kontrollbrønnene indikerer dette biofilmdannelse.

### 3 Resultater

#### 3.1 Vekstdynamikk i TSBSS

Isolater av henholdsvis '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) ble inokulert på 100ml TSBSS og målt for OD over tid. Målingen ble gjort hver 5. time, frem til kulturen nådde vekstplata. Resultatene er fremstilt i figur 3.1 og viser at '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' og *Pasteurella skyensis*-isolatene nådde platånivå etter 27 timers inkubasjon.

'*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' kulturen falt etter en vekstperiode på 2 timer, og var ikke dyrkbar etter 20 timer.



Figur 3.1: Linjediagrammet viser vekstdynamikken til '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) i TSBSS.

#### 3.1.1 Undersøkelser av gramfarget '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' i TSBSS kultur

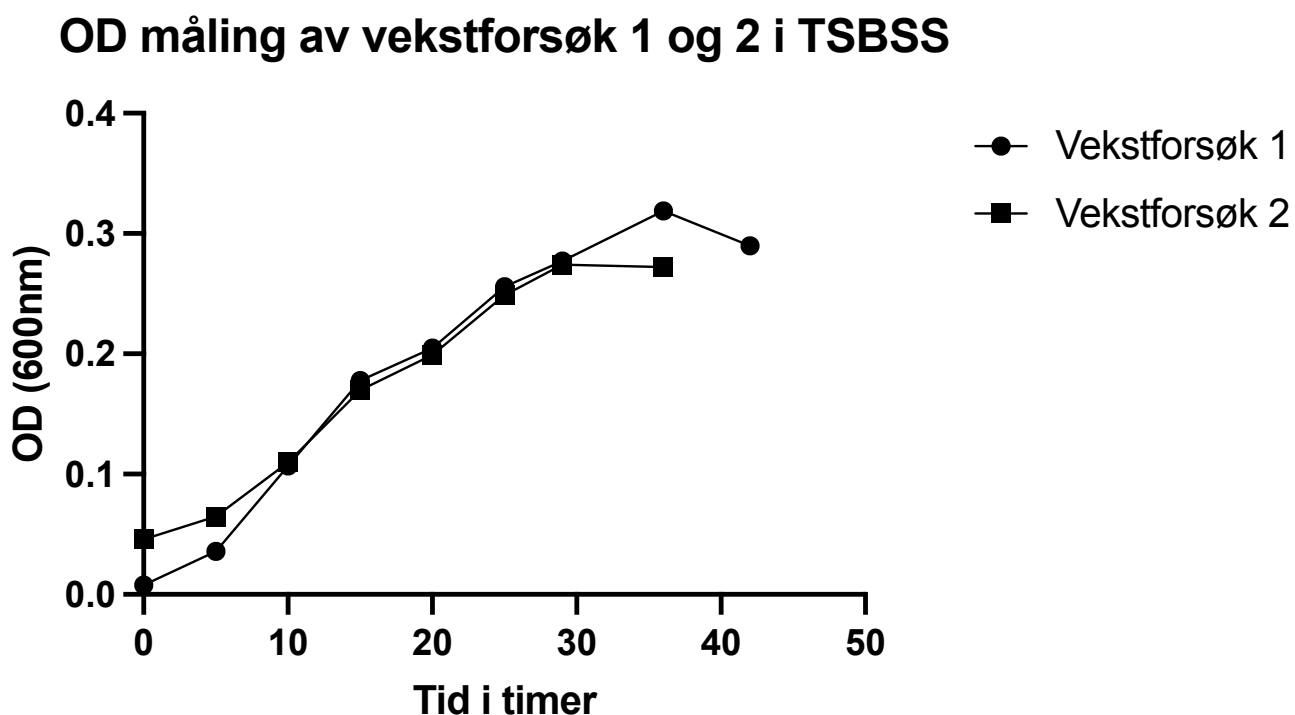
Det ble gjennomført gramfarging og påfølgende oljeimmersjonsmikroskopi av '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) for å undersøke hvorvidt cellene var intakt på bakgrunn at det ikke lyktes å få vesentlig oppformering av bakterien i TSBSS (se avsnitt 3.1).

Med mikroskopi av det gramfargede preparatet lyktes det ikke å finne intakte bakterier.

### 3.2 Vekstforsøk 1 og 2: Sammenligning av vekstdynamikk i TSBSS undersøkt ved måling av OD, CFU og Ct-verdier for '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'

Et isolat av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ble oppdyrket og inokulert på TSBSS. Kulturen ble målt for OD, CFU og det ble gjort qPCR-analyse etter metodene i avsnitt 2.8 og 2.8.1 hver 5. time gjennom døgnet inntil 42 timer etter oppstart. Forsøket ble i sin helhet gjennomført to ganger.

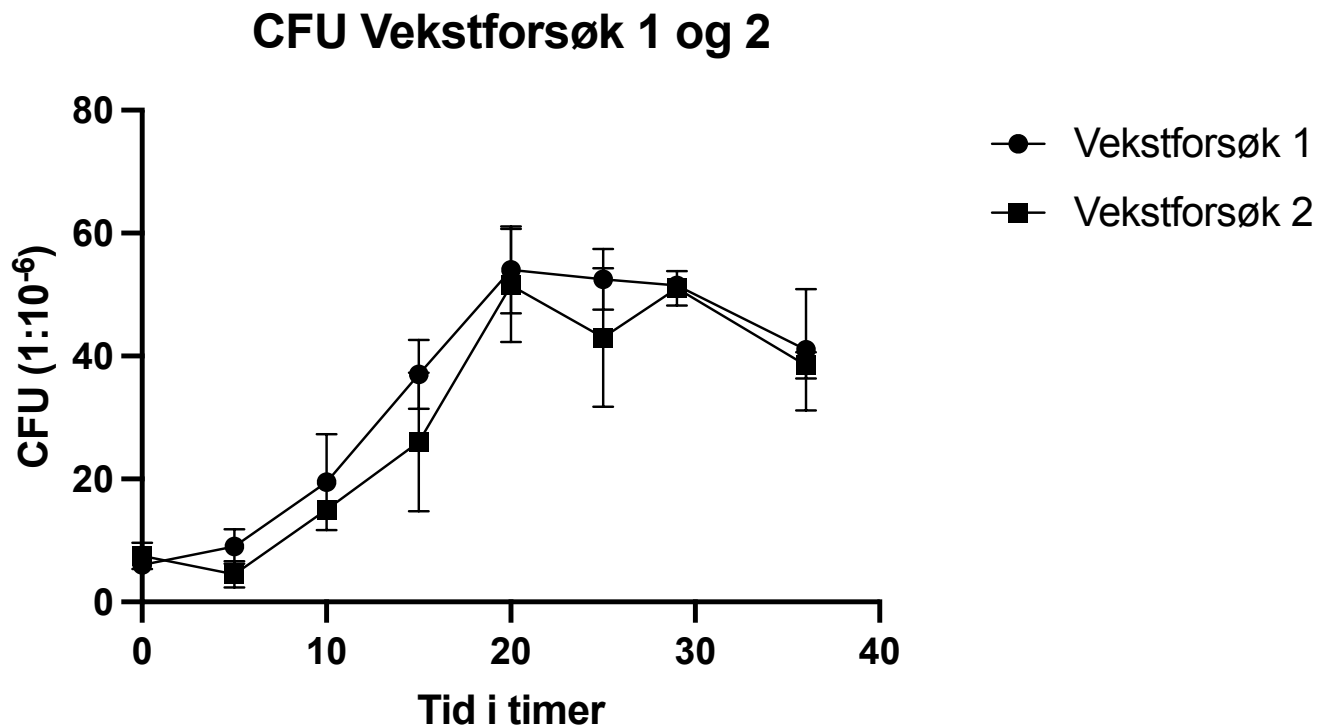
Resultater fra OD måling kan sees i figur 3.2 og viser at kulturene fulgte hverandre tett gjennom forsøkene. Kulturen i vekstforsøk 1 nådde platånivå ved en noe høyere absorpsjons sammenlignet med vekstforsøk 2. Begge kulturene hadde svært like absorpsjonsmålinger i den eksponentielle vekstfasen.



Figur 3.2: Viser OD-måling av vekstdynamikk med '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i TSBSS.

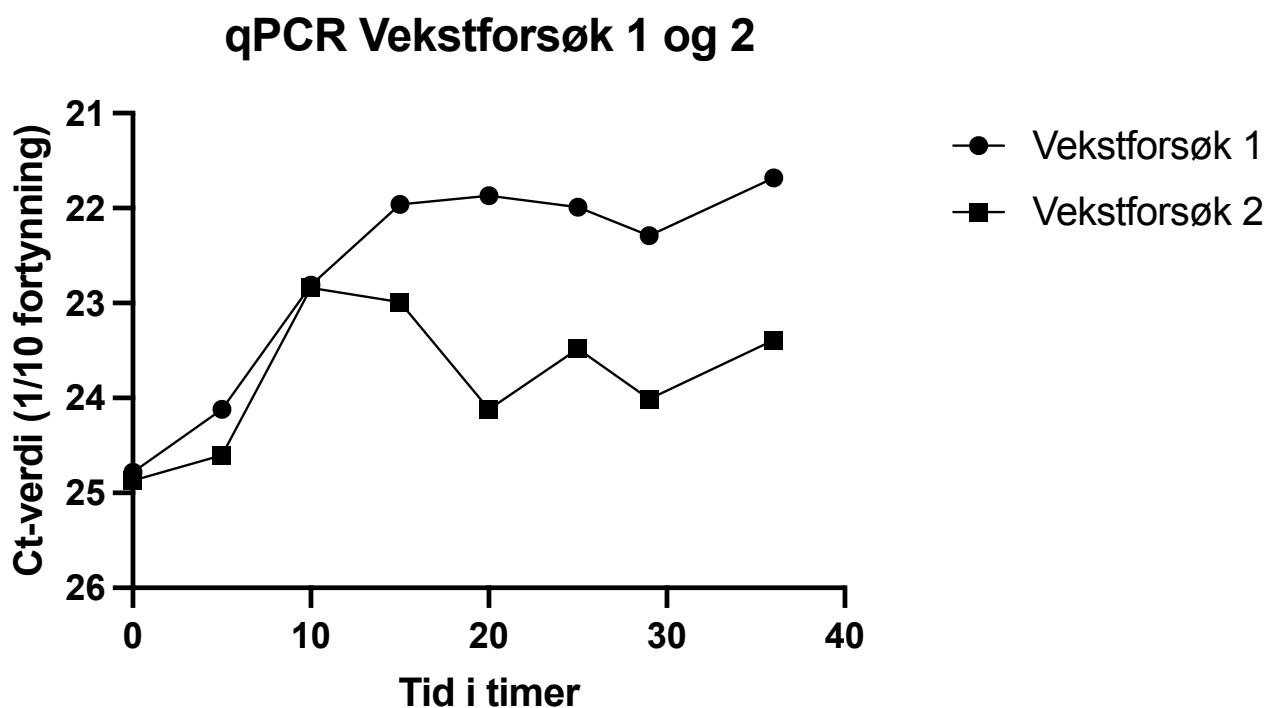
Hver 5. time i forsøket som varte totalt 42 timer ble det gjort en tifoldsfortynningsrekke som ble strøket ut i duplikater på BAS skåler. Ti-foldsfortynningen ga en fortløpig fortynning av bakterietettheten. Etter inkubasjon ble det telt CFU på skålene og resultater fra fortynningsgrad 1:10<sup>6</sup> er fremstilt i figur 3.3 Det ble gjort en gjennomsnittsberegning av CFU mellom

duplikatene for hver fortykning. I figur 3.3 sees standardavviksgrener som viser spredningen i CFU mellom duplikatene. Resultater fra telling av CFU viser at kulturene fra begge forsøk nådde et vekstplata etter 20 timers inkubasjon. I den eksponentielle vekstfasen kan det sees en større dispersjon mellom de to forsøkene samtidig som standardavviket er større.



Figur 3.3: Viser gjennomsnitt av CFU for vekstforsøk 1 og 2 fra 10<sup>-6</sup>fortynning med standardavvik..

Resultater fra qPCR sees i figur 3.4. Av figuren kan en se at Ct-verdier fra de to vekstforsøkene følger hverandre tett fra time 0 til time 10. Etter time 15 ser en fra vekstforsøk 1 Ct-verdier som stabiliserer seg på omtrentlig 22. Samtidig avviker vekstforsøk 2 der en ser Ct-verdier som fluktuerer rundt verdiområde 23-24.

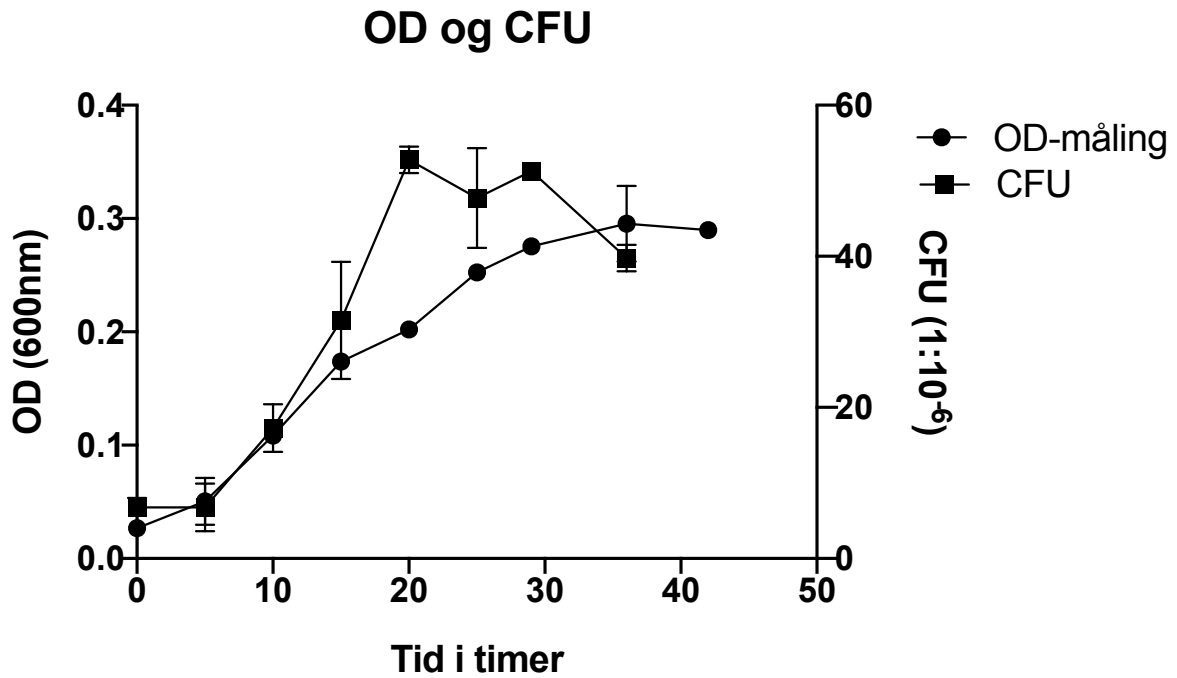


Figur 3.4: Viser sammenligning av Ct-verdier etter qPCR analyse mot *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* for vekstforsøk 1 og 2.

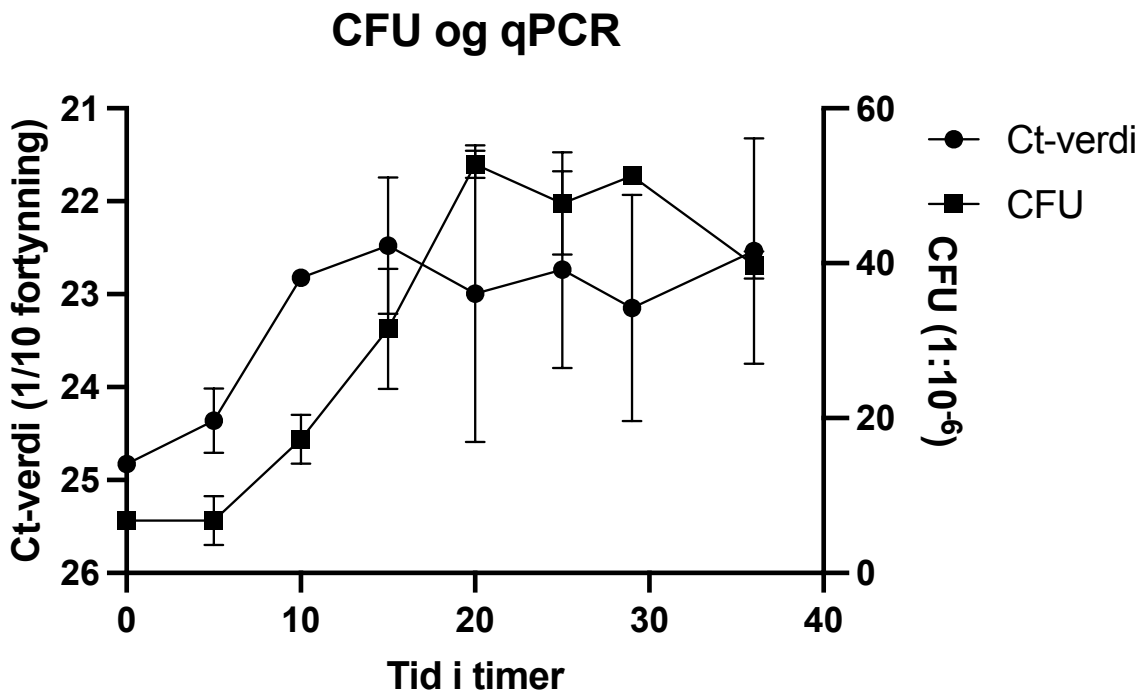
Sammenligner en resultatene fra figur 3.2, 3.3 og 3.4 kan en se at ved OD-måling (figur 3.2) og CFU (figur 3.3) gir de to vekstforsøkene relativt like resultater. Sammenligner en derimot Ct-verdiene (figur 3.4) fra qPCR er det et større avvik mellom de to forsøkene etter 10 timer.

Av figur 3.5 kan en se korrelasjonen mellom CFU og OD-målinger for de to vekstforsøkene. Av grafen kan en se at den eksponentielle vekstfasen var raskere overstått for CFU enn tettheten fra OD-målingene. Videre fluktuerer antall CFU i tidsrommet 20-30 timer og synker etter 29 timer.

Av figur 3.6 kan en se korrelasjonen mellom Ct-verdier og CFU fra de to vekstforsøkene. Av grafen ser en et stort standardavvik for Ct-verdiene av mellom vekstforsøk 1 og 2. Videre virker Ct-verdiene å stabilisere seg tidligere rundt tidsrommet 10-15 timer, mens antall CFU ser ut til å øke helt frem til 20 timer.



Figur 3.5: Viser sammenligning OD målinger og CFU for 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' inokulert i TSBSS. Grafen er fremstilt ved gjennomsnittsberegning av CFU og OD resultater fra vekstforsøk 1 & 2 og inkluderer standardavviket mellom de to.



Figur 3.6: Viser sammenligning av Ct-verdi og CFU for 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' inokulert i TSBSS. Grafen er fremstilt ved gjennomsnittsberegning av CFU og Ct-verdier fra vekstforsøk 1 & 2 og inkluderer standardavviket mellom de to.

Gjennom utregning basert på resultatene fra CFU (figur 3.3) ble det beregnet omtrentlig dyrkbar tetthet i TSBSS kulturen over tid (Tabell 3.1). Korrelerer en OD-målingene (figur 3.2) med CFU utregningen kan en bruke disse resultatene til å gi et anslag av den dyrkbare tettheten i TSBSS kulturen i sanntid.

Tabell 3.1: Viser beregnet CFU/ml i TSBSS kultur over tid ved å korrelere OD-målinger med CFU målinger. .

Tid i timer	0	5	10	15	20	25	29	36
OD	0,03	0,05	0,11	0,17	0,20	0,25	0,28	0,30
CFU 10 <sup>-6</sup>	7	7	17	32	53	48	51	40
CFU/ml i TSBSS	7 x 10 <sup>7</sup>	7 x 10 <sup>7</sup>	1.7 x 10 <sup>8</sup>	3.2 x 10 <sup>8</sup>	5.3 x 10 <sup>8</sup>	4.8 x 10 <sup>8</sup>	5.1 x 10 <sup>8</sup>	4.0 x 10 <sup>8</sup>

### 3.3 Undersøkelse av miljøoverlevelse hos '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i mikrokosmer

Et isolat av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624) ble dyrket opp på BAS og identiteten ble bekreftet ved MALDI-TOF analyse. Isolatet ble så inokulert på TSBSS kultur og målt for OD. Tabell 3.1 ble nyttet til å estimere mengden TSBSS som måtte vaskes og tilføres mikrokosmene for å oppnå en dyrkbar tetthet på 1 x 10<sup>6</sup> CFU/ml '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i hver av mikrokosmene. For mikrokosmene på 15 °C ble uttaket gjort etter 10 timers inkubasjon når kulturen var målt til en OD på 0,11. Ved å bruke tabell 3.1 ble det vasket og tilført 6 ml TSBSS kultur til hver av mikrokosmene, noe som tilsvarer en estimert CFU/ml på 1,02 x 10<sup>6</sup>. Til mikrokosmene på 4 og 10 °C ble uttaket fra TSBSS kulturen gjort etter 15 timers inkubasjon, når kulturen var målt til en OD på 0,186. Basert på tabell 3.1 ble det derfor vasket og tilført 3,2 ml TSBSS til hver av mikrokosmene som skulle tilsvare en estimert startkonsentrasjon på 1,008 x 10<sup>6</sup> CFU/ml.

For å se den retrospektive mengden dyrkbare enheter av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' tilført til mikrokosmene ble det gjennomført en fortynningsrekke av TSBSS kulturen. Av samme årsak ble det også foretatt en fortynningsrekke av mikrokosmene etter bakteriene var tilsatt. Den estimerte mengden og den faktiske mengden kan sees tabell 3.2. I tabellen kan en se at det for alle temperaturer var en høyere CFU/ml i TSBSS kulturen enn det som var estimert på bakgrunn av resultatene i vekstforsøk 1 og 2 (se tabell 3.1). Videre var den faktiske CFU/ml lavere enn estimert for alle mikrokosmene foruten mikrokosme 1 på 15 °C (se tabell 3.2). Av den faktiske CFU/ml i mikrokosmene som ble holdt på 4 og 10 °C kan en se at variasjonen mellom triplikatene var betydelig mindre sammenlignet med mikrokosmene på 15 °C.

Tabell 3.2: Viser mengden TSBSS som ble vasket og tilført hver av mikrokosmene. Viser videre den estimerte (rundet opp til to desimaler) og faktiske dyrkbare kolonitettheten (rundet opp til to desimaler) av 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' i henholdsvis TSBSS kulturen og mikrokosmene.

Mikrokosme ID (MK)	OD måling TSBSS kultur	Uthentet mengde (ml) TSBSS	Estimert CFU/ml i TSBSS	Faktisk CFU/ml i TSBSS	Estimert CFU/ml i mikrokosme ved start	Faktisk CFU/ml i mikrokosme ved start
MK 1 (4°C)	0,186	3,2	$3,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$
MK 2 (4°C)	0,186	3,2	$3,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$
MK 3 (4°C)	0,186	3,2	$3,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$
MK 1 (10°C)	0,186	3,2	$3,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$
MK 2 (10°C)	0,186	3,2	$3,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
MK 3 (10°C)	0,186	3,2	$3,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$
MK 1 (15°C)	0,110	6,0	$1,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
MK 2 (15°C)	0,110	6,0	$1,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$0,9 \times 10^5$
MK 3 (15°C)	0,110	6,0	$1,7 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$

### 3.3.1 Miljøoverlevelse 'P. atlantica gv. salmonicida' ved ulike temperaturer

Mikrokosmene (MK) ble inkubert ved henholdsvis 4, 10 og 15 °C. Annenhver dag ble flaskene ristet før det ble tatt ut 1 ml fra hver mikrokosme til fortynningsrekke og gjort utstryk for å undersøke hvor lenge 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' var dyrkbar samtidig som en ønsket å kartlegge hvilke andre bakteriearter som var til stede.

Fra mikrokosmene inkubert på 4 °C ble det ved starten av forsøket funnet vekst av 'P. atlantica gv. salmonicida' som tilsvarte en dyrkbarkolonitetthet på omtrentlig  $3,3 \times 10^5$  CFU/ml i hver av triplikaten. Etter to døgn fikk en fra MK 1 og 2 vekst på mellom 126-174 kolonier av 'P. atlantica gv. salmonicida' fra 1:10 fortykning, noe som tilsvarer en tetthet på  $1,26-1,74 \times 10^4$  CFU/ml i mikrokosmene. Fra MK3 var det derimot i gjennomsnitt kun 25 kolonier tilsvarende 2500 CFU/ml etter 2 døgn inkubasjon. Neste prøveuttak var på dag 5 av forsøket, og fra det



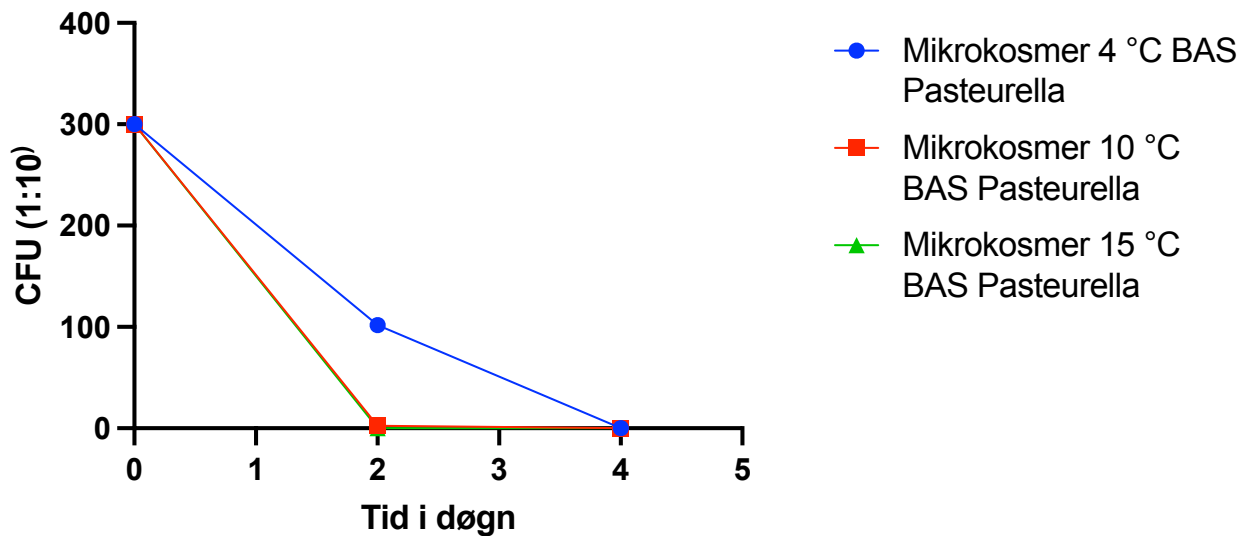
utstryket og i alle andre påfølgende utstryk klarte en ikke påvise vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' i noen av mikrokosmene.

Utstryk fra mikrokosmene inkubert ved 10 °C grader ga ved starten av forsøket en vekst av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' som i gjennomsnitt tilsvarte  $3,15 \times 10^5$  CFU/ml. Fra utstryk på dag 2 av forsøket ble kun funnet dyrkbar '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' i MK 2 og 3. Fra disse ble det i 1:10 fortykning kun funnet henholdsvis 2 og 3 (Gjennomsnitt av parallell) kolonidannende enheter, noe som tilsvarer omtrentlig 2-300 CFU/ml i mikrokosmene. Etter dag 2 ble det ikke lenger funnet kolonier som kunne bekreftes å være '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'.

Mikrokosmene inkubert ved 15 °C viste på utstryk fra dag 0 en stor variasjon i antall CFU av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' mellom triplikatene. Fra MK 1 ble det fra  $10^3$  fortykning telt i gj.snitt 143 CFU, noe som tilsvarer en estimert dyrkbar tetthet på  $1,430 \times 10^6$  CFU/ml i mikrokosmen. Til sammenligning ble det fra MK 2 og MK 3 funnet en CFU som tilsvarer en estimert CFU/ml på henholdsvis  $9,0 \times 10^4$  og  $1,90 \times 10^5$  (Se tabell 3.2). På utstryk fra dag 2 av forsøket ble vekst av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' bare funnet hos MK 1. Her ble det telt 3 kolonier fra  $10^2$  fortykning bekreftet å være '*P. atlantica* gv. *salmonicida*', noe som tilsvarer en dyrkbar tetthet på estimert 3000 CFU/ml i mikrokosmen. På alle påfølgende prøvetakinger ble det ikke funnet kolonier av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'.

En sammenligning av CFU resultatene for mikrokosmene på temperatuene 4, 10 og 15 °C viser at det ikke ved noen temperatur lyktes å finne kolonidannende enheter av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' på utstryk gjort etter dag 2. Likevel er det forskjeller store i antall CFU på dag 2 av forsøket, der en av figur 3.7 kan se at 4 °C mikrokosmene har en langt høyere CFU sammenlignet med de andre temperatuene. Data i figur 3.7 er fremstilt ved å ta et gjennomsnitt av alle triplikatene i 1:10 fortykning for hver temperatur og viser derfor ikke nødvendigvis variasjonen i CFU mellom triplikatene innenfor hver temperatur.

### CFU Mikrokosmer 4 °C, 10 °C og 15 °C

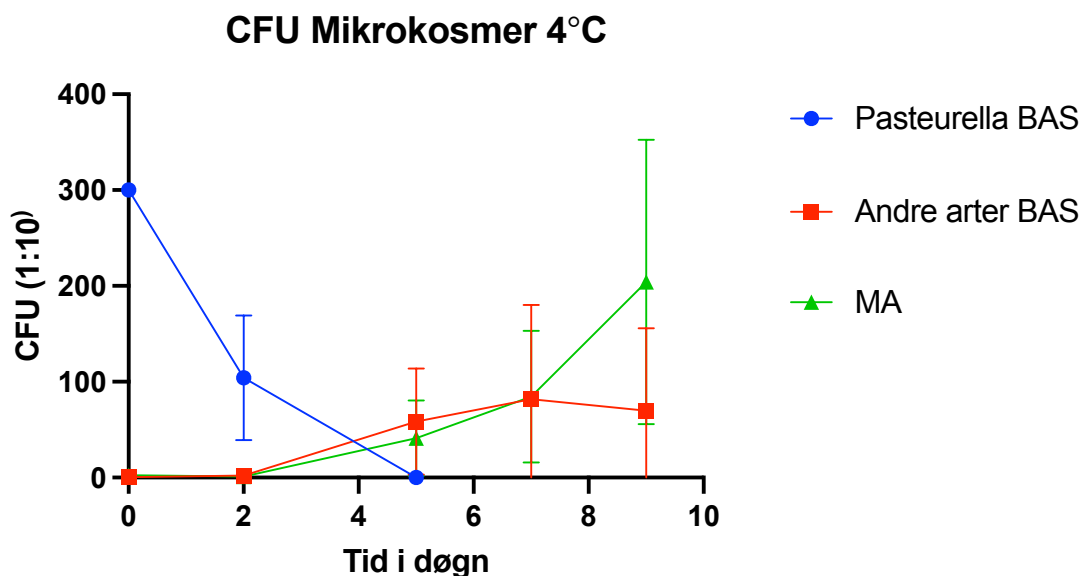


Figur 3.7: Viser variasjon over tid av antall CFU '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' utstrøket på BAS ved 1:10-fortynning. Grafen viser et gjennomsnitt av triplikater som er inkubert på temperaturene 4, 10 og 15 °C. Resultater for mikrokosmer inkubert ved 10 og 15 °C var så like at de følger hverandre tett i figuren og kan derfor være vanskelig å skille.

#### 3.3.2 Populasjonsdynamikk i mikrokosmer ved ulike temperaturer

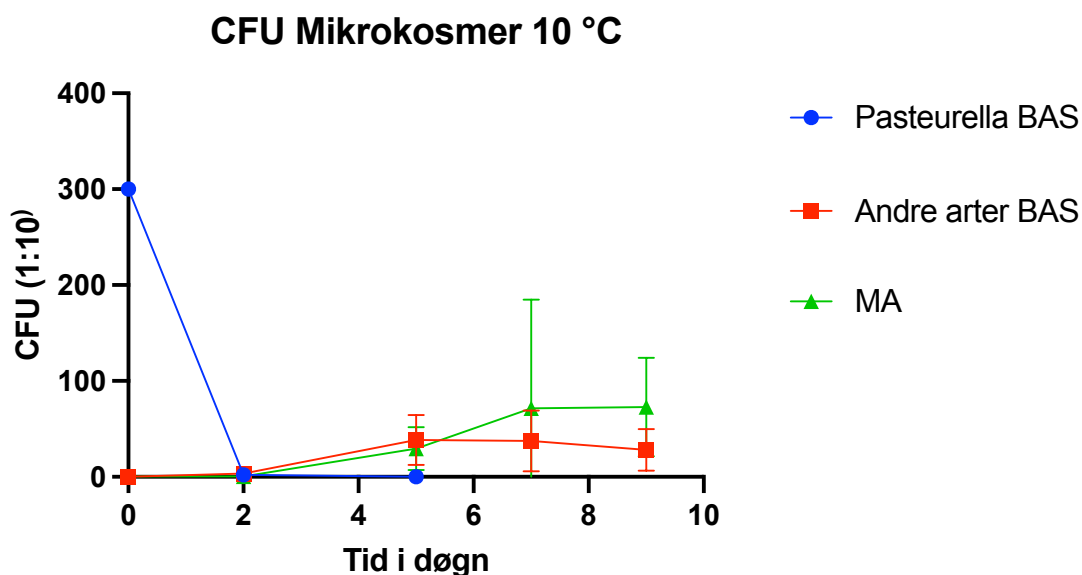
På utstryk fra mikrokosmene fikk en gjennom hele forsøket vekst av bakteriekolonier som ikke var '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. Disse ble telt med formål om å kartlegge hvordan populasjonsdynamikken endret seg underveis i forsøket.

For mikrokosmene som var inkubert på 4 °C var det i snitt vekst av kun et fåtall kolonier som var av andre arter (AA) enn '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. Etter 2 døgns inkubasjon var det en gradvis økning i antall AA-kolonier både på BAS og marineagar (MA) (figur 3.8). AA-koloniene på BAS stabiliserte seg i overkant av 150 CFU, mens CFU på MA økte kontinuerlig. Figur 3.8 er fremstilt ved å gjøre en gjennomsnittsberegning mellom triplikatene og viser standardavviket mellom disse.



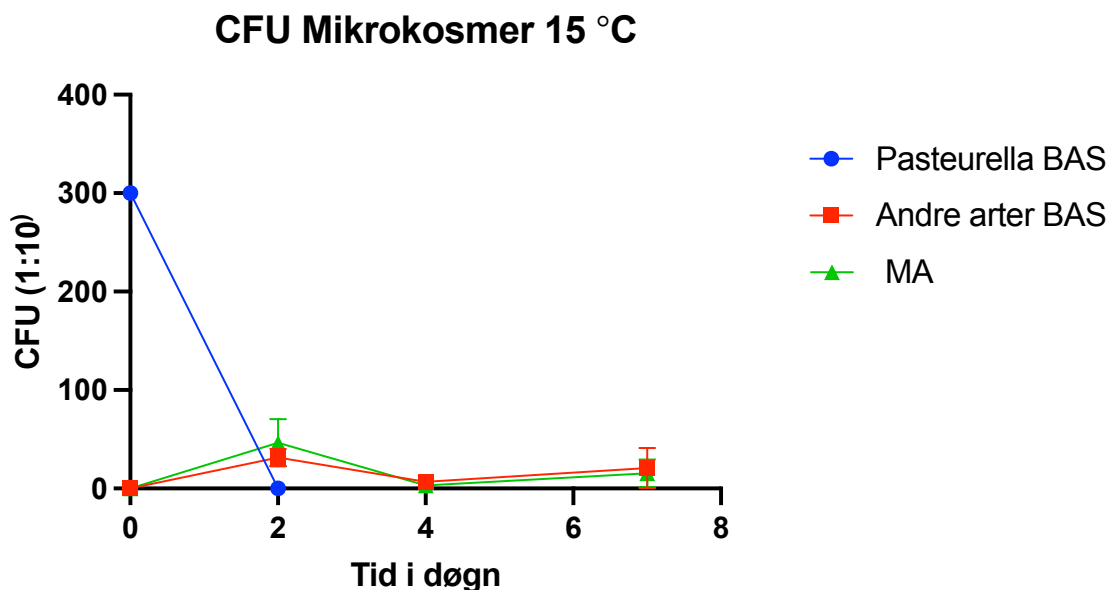
Figur 3.8: Viser antall CFU utstrøket for 'Pasteurella atlantica' salmonicida på BAS (Pasteurella BAS), for andre arter på BAS (Andre arter BAS) og Marineagar (MA). Det ble ikke funnet vekst av 'Pasteurella atlantica' gv. salmonicida' på MA-skåler. Grafen viser antall CFU fra en 1:10 fortynning. Data er fremstilt ved en gjennomsnittsberegning av triplikatene som ble inkubert på 4 °C.

Mikrokosmer inkubert på 10 °C viste en svak og gradvis vekst i gjennomsnitt av antall AA-kolonier både på MA og BAS (Figur 3.9). Figur 3.9 er fremstilt ved å gjøre en gjennomsnittsberegning mellom triplikatene og viser standardavviket mellom dem.



Figur 3.9: Viser antall CFU utstrøket for 'Pasteurella atlantica' gv. salmonicida' på BAS (Pasteurella BAS), for andre arter på BAS (Andre arter BAS) og Marineagar (MA). Det ble ikke funnet vekst av 'Pasteurella atlantica' gv. salmonicida' på MA-skåler. Grafen viser antall CFU fra en 1:10 fortynning. Data er fremstilt ved en gjennomsnittsberegning av triplikatene som ble inkubert på 10 °C.

Mikrokosmer inkubert på 15 °C viste lite vekst av AA-kolonier. Det høyeste antall CFU ble registrert etter to døgns inkubasjon og var i gjennomsnitt i underkant av 50 CFU fra 1:10 fortynning noe som tilsvarer 500 CFU/ml i mikrokosmen (Figur 3.10). Figur 3.10 viser en gjennomsnittsberegning mellom triplikatene som ble inkubert på 15 °C. Variasjonen mellom triplikatene er vist ved standardavvik.



Figur 3.10: Viser antall CFU utstrøket for 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' på BAS (Pasteurella BAS), for andre arter på BAS (Andre arter BAS) og Marineagar (MA). Det ble ikke funnet vekst av 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' på MA-skåler. Grafen viser antall CFU fra en 1:10 fortynning. Data er fremstilt ved en gjennomsnittsberegning av triplikatene som ble inkubert på 15 °C.

### 3.3.3 Populasjonsdynamikk i mikrokosmer: identifisering av dyrkbare kolonier

I mikrokosme forsøket (avsnitt 3.3) ble det kontinuerlig benyttet MALDI-TOF analyse til å bekrefte vekst av 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida', samtidig som det ble foretatt analyser av AA-kolonier for å kartlegge hvilke andre arter som var til stede i mikrokosmene.

Resultatet av MALDI-TOF analysen viser at det var svært få av AA-koloniene som ga ett treff i databasen til MALDI-TOF systemet. I løpet av forsøket ble det gjennomført i underkant av 250 kolonianalyser ved MALDI-TOF. I tabell 3.3 er alle analyser som ga treff fremvist, med unntak av treff for *Pasteurella* sp.

Tabell 3.3: Viser totalt antall organismer som ga treff i MALDI-TOF analyse med unntak av treff for *Pasteurella* sp. En score over 2.0 ansees som et sikkert treff på artnivå, en score mellom 1.70 og 2.0 ansees som sikkert treff på genusnivå og en score under 1.70 vurderes som ingen resultat.

Dag	Mikrokosme ID	Organisme (Beste treff)	Score
0	MK 3 (4 °C)	<i>Shewanella woodyi</i>	1,99
0	MK 3 (3 °C)	<i>Vibrio splendidus</i>	2,06
0	MK 2 (4 °C)	<i>Vibrio splendidus</i>	1,73
2	MK 2 (15 °C)	<i>Vibrio splendidus</i>	1,81
2	MK 1 (15 °C)	<i>Vibrio splendidus</i>	1,77
2	MK 1 (15 °C)	<i>Shewanella woodyi</i>	1,74
2	MK 1 (15 °C)	<i>Vibrio splendidus</i>	1,92
2	MK 3 (15 °C)	<i>Shewanella kaireitica</i>	1,76
4	MK 2 (15 °C)	<i>Shewanella japonica</i>	1,72
7	MK 2 (15 °C)	<i>Shewanella kaireitica</i>	1,94
7	MK 3 (15 °C)	<i>Shewanella japonica</i>	1,74
9	MK 1 (10 °C)	<i>Vibrio splendidus</i>	2,25
9	MK 2 (4 °C)	<i>Shewanella colwelliana</i>	1,70
9	MK 3 (4 °C)	<i>Shewanella japonica</i>	1,92
9	MK 2 (10 °C)	<i>Flavobacterium gelidilacus</i>	2,03

### 3.3.4 Undersøkelse av veksthemming

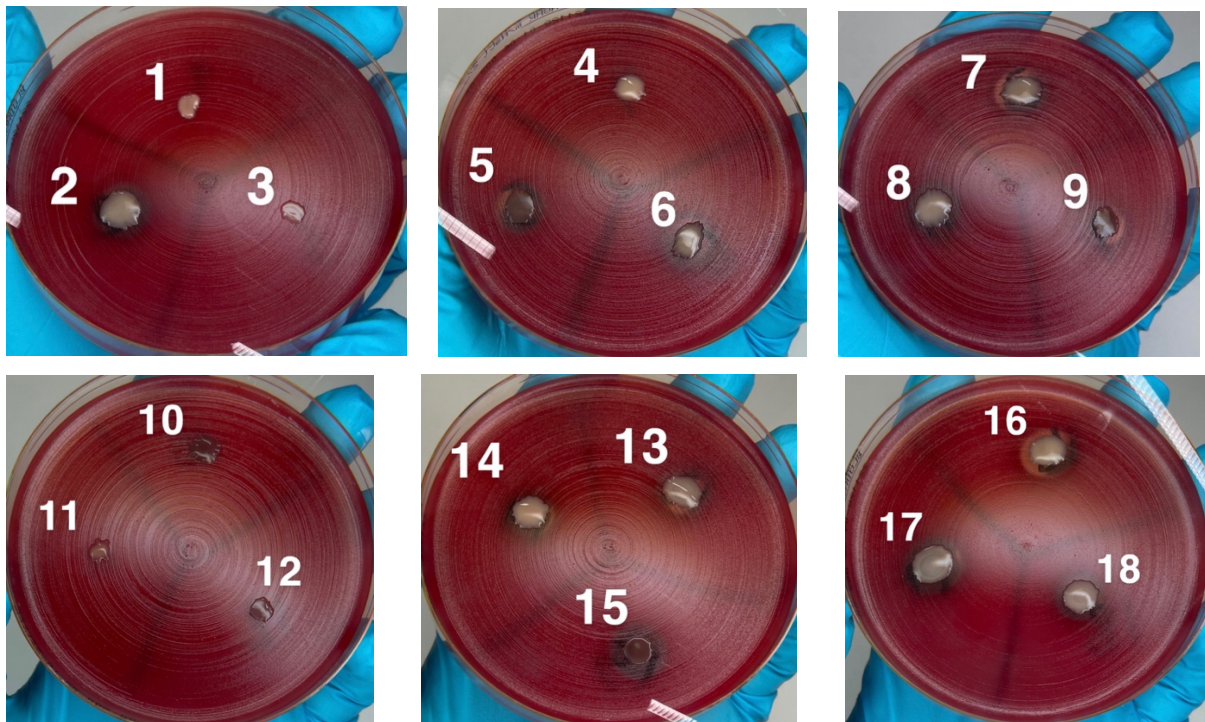
Det ble valgt ut 18 AA-kolonier fra BAS skålene brukt i mikrokosmeforsøket. Det ble forsøkt å velge ut kolonier som var morfologisk ulike. Disse ble overført til BAS skåler med som var dyrket opp med teppevekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. Formålet var å undersøke hvorvidt AA-koloniene som vokste etter utstryk fra mikrokosmene kunne hemme vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' på skål.

Resultatet av forsøket er at det ikke ble funnet veksthemmingssoner for noen av de 18-koloniene. Koloni nummer 5, 6, 7, 9, 13, 14 og 16 ble funnet å være  $\beta$ -hemolytisk. Bilder fra undersøkelse av skålene kan sees i figur 3.11. Det ble gjort MALDI-TOF analyse av alle

kolonier. Resultater fra analysen er fremvist i tabell 3.4. Det ble ikke funnet treff i databasen for koloni nr 3, 12 og 15.

*Tabell 3.4: Viser totalt antall organismer som ga treff i MALDIi-TOF analyse av de 18 kolonier i forsøket. En score over 2.0 ansees som et sikkert treff på artnivå, en score mellom 1.70 og 2.0 ansees som sikkert treff på genusnivå og en score under 1.70 oppgis som ingen resultat*

<b>Koloninummer</b>	<b>Organisme (Beste treff)</b>	<b>Score</b>
1	<i>Shewanella japonica</i>	1.78
2	<i>Vibrio splendidus</i>	2.29
4	<i>Vibrio splendidus</i>	2.05
5	<i>Vibrio splendidus</i>	2.05
6	<i>Vibrio splendidus</i>	2.26
7	<i>Vibrio splendidus</i>	2.17
8	<i>Vibrio splendidus</i>	2.05
9	<i>Vibrio splendidus</i>	1.76
10	<i>Shewanella marinintestina</i>	2.12
11	<i>Shewanella japonica</i>	1.83
13	<i>Vibrio splendidus</i>	2.14
14	<i>Vibrio splendidus</i>	2.30
16	<i>Vibrio splendidus</i>	2.16
17	<i>Vibrio splendidus</i>	2.05
18	<i>Vibrio splendidus</i>	1.95



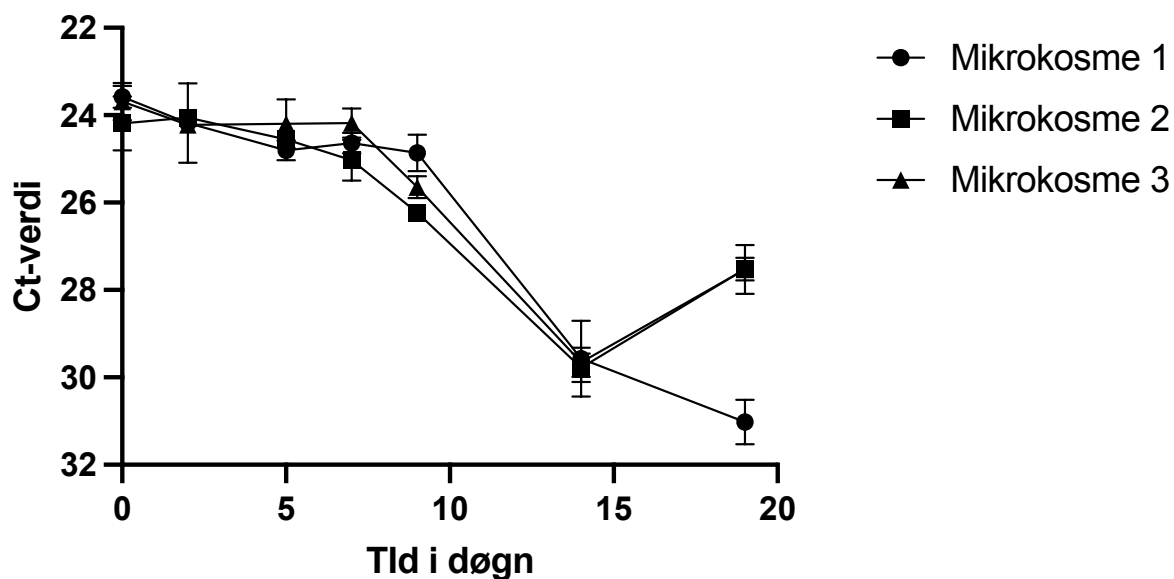
Figur 3.11: Viser vekst av 18 tilfeldig valgte AA-kolonier på en skål dekket med *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*.

### 3.3.5 qPCR basert estimering av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' overlevelse

Det ble filtrert prøver fra mikrokosmer med formål om å gjøre en qPCR-analyse med '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' spesifikke prober for å se på variasjoner i Ct-verdi over tid. Ved qPCR analyse av mikrokosmene kan en monitorere endringen av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' genomekvivalenter over tid. Fullstendig tabell som viser alle Ct-verdier fra qPCR-analyse av mikrokosmene kan sees i Appendiks III.

Analyser fra mikrokosmer inkubert på 4 °C viser at de tre mikrokosmene ga nærliggende Ct-verdier på dag 0 i område rundt 23-24. Videre var det en gradvis reduksjon i genomekvivalenter frem mot dag 7. På dag 14 av forsøket steg Ct-verdiene til omtrentlig 29 for alle de tre mikrokosmene. Ct-verdier fra dag 19 av forsøket viser at mikrokosme 1 hadde et fortsettende nedgang av genomekvivalenter til en Ct-verdi på omtrent 31, mens mikrokosme 2 og 3 hadde en svak økning, til en Ct-verdi i område 27-28. Fra hver mikrokosme ble det tatt ut prøver i triplikater. I figur 3.12 er det gjort et gjennomsnitt av disse triplikatene for hver av de tre mikrokosmene fremstilt. Det er lagt inn standardavvik som viser variasjonen i Ct-verdi for hver av triplikatene.

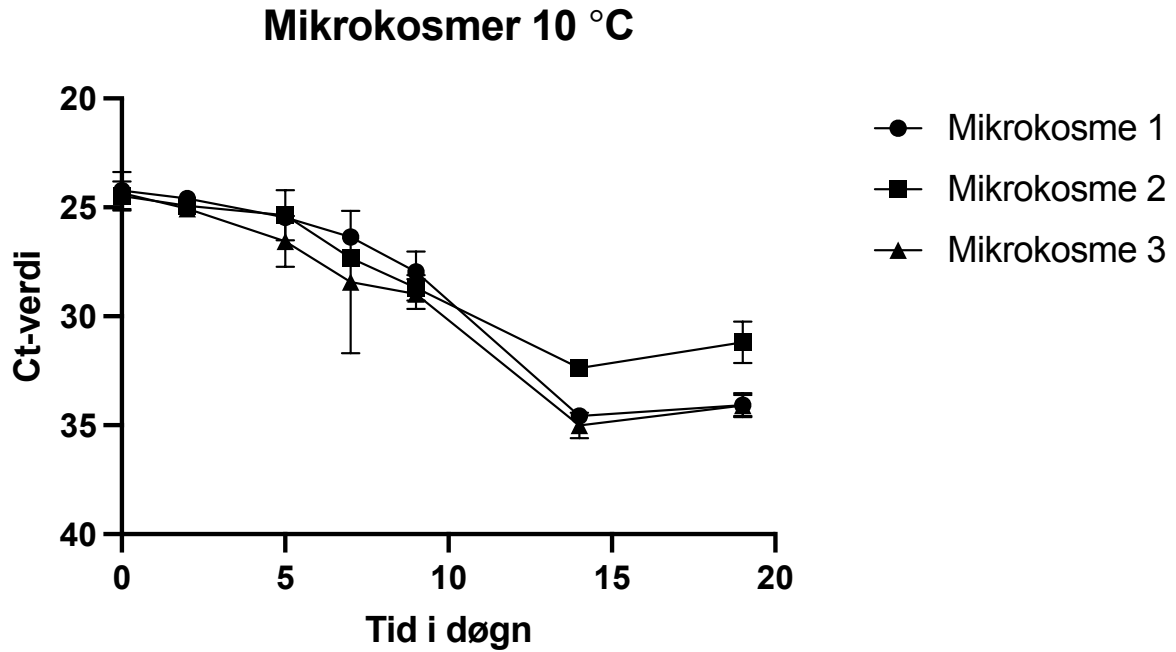
### Mikrokosmer 4 °C



Figur 3.12: Viser Ct-verdier fra qPCR analyse av mikrokosmer inkubert på 4 °C over en tidsperiode på 19 døgn. Fra hver mikrokosme ble det tatt ut prøver i triplikater. Grafen viser en gjennomsnittsberegning av Ct-verdiene for hvert triplikat med tilhørende standardavvik.

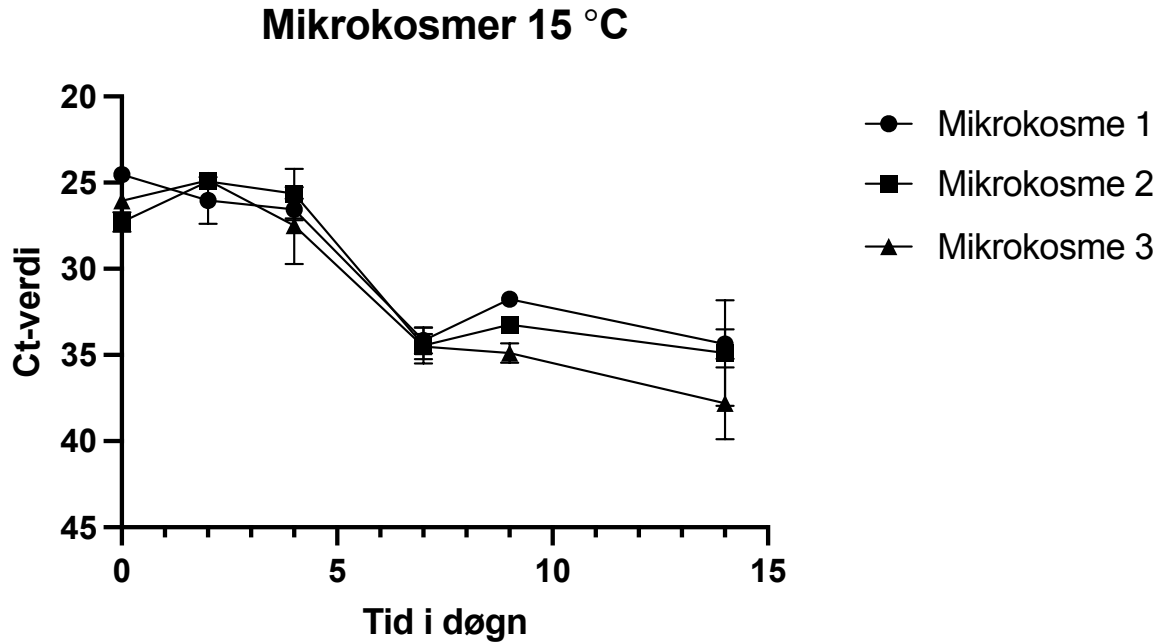
Resultat fra qPCR analyse av mikrokosmer inkubert på 10 °C viser at alle tre mikrokosmer hadde en gradvis reduksjon i genomekvivalenter frem til dag 14 av forsøket. Analyser fra dag 7 viser et større standardavvik mellom triplikatene sammenlignet de andre prøveuttakene. I figur 3.13 kan en se utviklingen i Ct-verdi over tid for de tre mikrokosmene. Grafen er fremstilt ved å gjøre en gjennomsnittsberegning av triplikatenes Ct-verdi for hver mikrokosme, med tilhørende standardavvik.





Figur 3.13: Viser Ct-verdier fra qPCR analyse av mikrokosmer inkubert på 10 °C over en tidsperiode på 19 døgn. Fra hver mikrokosme ble det tatt ut prøver i triplikater. Grafen viser en gjennomsnittsberegning av Ct-verdiene for hvert triplikat med tilhørende standardavvik.

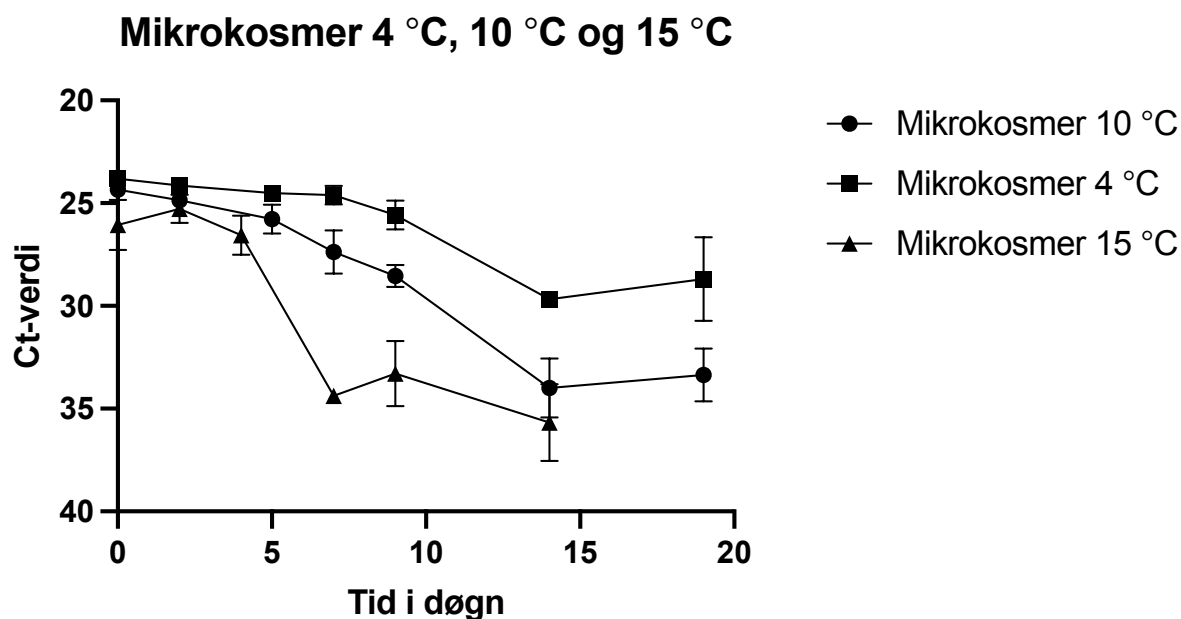
Ct-verdier fra qPCR analyser av mikrokosmer inkubert på 15 °C er fremstilt i figur 3.14. Figuren er fremstilt ved å gjøre en gjennomsnittsberegning av Ct-verdiene fra prøvetriplikatene av hver mikrokosme med tilhørende standardavvik. Av figuren kan en se at det på dag 0 var noe variasjon i registrert mengde genomekvivalenter mellom mikrokosmene. Videre var det fra dag 4 til dag 9 en økning i Ct-verdi fra 25-27 til i underkant av 35. Fra dag 9 og videre sees kun en gradvis reduksjon av genomekvivalenter.



Figur 3.14: Viser Ct-verdier fra qPCR analyse av mikrokosmer inkubert på 15 °C over en tidsperiode på 19 døgn. Fra hver mikrokosme ble det tatt ut prøver i triplikater. Grafen viser en gjennomsnittsberegning av Ct-verdiene for hvert triplikat med tilhørende standardavvik

I figur 3.15 fremstilles en sammenligning av resultatene fra qPCR analysen for mikrokosmer inkubert på 4, 10 og 15 °C. Grafen er fremstilt ved å først gjøre en gjennomsittsberegning av triplikatene for hver mikrokosme på de forskjellige temperaturene før det så på nytt ble gjort en gjennomsnittsberegning av de 3 mikrokosmene på hver inkubasjonstemperatur. Det er lagt til standardavvik som viser forskjellen i gjennomsnitts Ct-verdi mellom de 3 mikrokosmene for hver temperatur.

En ser antall genomekvivalenter faller hurtigere ved 15 °C enn det som blir sett ved lavere temperaturer. Videre ser en at på lavere temperaturer reduseres mengden genom ekvivalenter i mikrokosmene saktere, samtidig som de stabiliserer seg på lavere Ct-verdier.



Figur 3.15: Viser en sammenligning av Ct-verdier fra qPCR analyse av mikrokosmer inkubert på 4, 10 og 15 °C over en tidsperiode på 19 døgn.

For hver inkubasjonstemperatur var det inkludert en kontroll mikrokosme uten tilsetning av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'.

Det ble gjort qPCR analyse av disse mikrokosmene og 10 av disse analysene ga positivt analyseresultat for '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. Totalt ble det gjennomført 60 qPCR analyser av kontroll-mikrokosmene. De positive Ct-verdiene fra kontrollmikrokosmene er fremvist i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Viser de Ct-verdiene som var positive etter qPCR analyse av kontroll-mikrokosmene.

Inkubatorstemperatur	DAG	Ct-verdi	Threshold (dR)
4 °C	7	37,05	130,11
10 °C	7	36,46	130,11
10 °C	7	37,16	130,11
10 °C	14	36,59	130,11
10 °C	14	35,35	130,11
15 °C	2	29,63	128,94
15 °C	2	30,45	128,94
15 °C	2	29,7	128,94
15 °C	4	36,77	128,94
15 °C	14	36,12	130,11

### 3.4 Agardiffusjon: Undersøkelse av antibiotikasensitivitet

Bakterieisolatene '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) ble sensitivitetstestet for en rekke antibiotika ved agardiffusjon.

I forsøket ble isolatene *Staphylococcus aureus* (CCUG 17621) og *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (NCIMB 1102) benyttet som kontroller. Diffusjonssoner fra kontroller ble kvalitetssikret opp mot kvalitetskontroll (QC) verdiene fastsatt i Clinical and Laboratory Standards Institute veterinary antimicrobial susceptibility testing guideline VET04 (CLSI, 2020)

Resultater fra *Staph. aureus* kvalitetskontroll viser at alle diffusjonssoner tilgjengelig var innenfor QC-grenseverdiene som fremkommer av VET04 (se tabell 3.6). Det gjøres oppmerksom på at QC-verdiene for *Staph. aureus* i VET04 er gjort ved bruk av Mueller-Hinton agar (MHA). I dette forsøket ble det nyttet blodagar for diffusjonstesting av *Staph. aureus*. Videre gjøres det oppmerksom på at det er forskjeller i mengde antibiotika brukt her sammenlignet med det som ble brukt i VET04 for preparatene ampicillin, amoxycillin clavulansyre 2:1, sulphamethoxazole trimethoprim og nitrofurantoin (Tabell 3.6)

Tabell 3.6: Viser diffusjonstesting av *Staph. aureus* for ulike antibiotika. Mengde VET04 referer til mengde brukt i VET04. QC diameter referer til grenseverdier satt i VET04. Mengde testet referer til mengde brukt i forsøket. Avlest diameter referer til den oppnådde diffusjonssonen i forsøket.

Antibiotika (kode)	Mengde VET04	Mengde testet	QC diameter (mm)	Avlest diameter (mm)
Ampicillin	30 µg	2 µg	27-35	30
Neomycin	30 µg	30 µg	18-26	22
Chloramphenicol	30 µg	30 µg	19-26	25
Pencillin G		1 unit		32
Amoxycillin clavulansyre 2:1	20/10 µg	30 µg	28-36	36
Cefotaxime		5 µg		25
Clindamycin	2 µg	2 µg	24-30	27
Tobramycin		10 µg		21
Sulphamethoxazole trimethoprim	1.25/23.75 µg	25 µg	20-26	20
Nitrofurantoin	300 µg	100 µg	18-22	19

Fusidic acid		10 µg		23
Erythromycin	15 µg	15 µg	22-30	25
Tetracycline	30 µg	30 µg	24-30	30
Cefoxitin	30 µg	30 µg	23-29	28
Nalidixic acid		30 µg		0
Polymyxin		300 units		0
Oxacillin	1 µg	1 µg	18-24	24
Florfenicol	30 µg	30 µg	22-29	26
Ceftazidime		10 µg		20
Ciprofloxacin		5 µg		25
Gentamicin	10 µg	10 µg	19-27	22
Meropenem		10 µg		33
Trimethoprim		5 µg		22
Ampicillin	10 µg	10 µg	27-35	34
Cephalexin		30 µg		28

Resultater fra diffusjonstesting av *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (NCIMB 1102) og QC-grenser grenser fra VET04 fremkommer i tabell 3.7. Av tabellen kan en se at den oppnådde diffusjonsdiameteren ved sulphamethoxazole trimethoprim, sentamicin og ampicillin ikke er innenfor de QC-grenseverdiene satt i VET04 for det aktuelle isolatet. Det gjøres oppmerksom på at QC-verdiene i VET04 er gjort ved bruk av MHA mens det i dette forsøket ble nyttet blodagar etter Veterinærinstituttets praksis for sensitivitetstesting av fiskepatogene bakterier. Videre gjøres det oppmerksom på at konsentrasjonen varierer fra den oppgitt i VET04 for sulphamethoxazole trimethoprim.

Tabell 3.7: Viser diffusjonssoner hos *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* for en rekke antibiotika. Inkluderer QC-verdier og mengde antibiotika fra VET04.

Antibiotika (kode)	Mengde VET04	Mengde testet	QC diameter (mm)	Avlest diameter (mm)
Ampicillin		2 µg		24
Neomycin		30 µg		18
Chloramphenicol		30 µg		34
Pencillin G		1 unit		0
Amoxycillin clavulansyre 2:1		30 µg		34
Cefotaxime		5 µg		33
Clindamycin		2 µg		0
Tobramycin		10 µg		17

Sulphamethoxazole trimethoprim	1.25/23.75 µg	25 µg	24-39	22
Nitrofurantoin		100 µg		0
Fusidic acid		10 µg		0
Erythromycin	15 µg	15 µg	19-31	19
Tetracycline		30 µg		37
Cefoxitin		30 µg		41
Nalidixic acid		30 µg		41
Polymyxin		300 units		21
Oxacillin		1 µg		0
Florfenicol	30 µg	30 µg	34-47	35
Ceftazidime		10 µg		37
Ciprofloxacin		5 µg		47
Gentamicin	10 µg	10 µg	22-32	21
Meropenem		10 µg		28
Trimethoprim		5 µg		37
Ampicillin	10 µg	10 µg	35-44	32
Cephalexin		30 µg		25

Resultatet av agardiffusjonstesting av de tre bakterieisolatene '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' (VIB 3624), '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' (VIB 5284) og *Pasteurella skyensis* (VIB 3645) er fremvist i tabell 3.8.

Av tabellen kan en se at alle de tre bakterieisolatene ble det påvist relativt små diffusjonssoner ved testing for antibiotikumene neomycin, clindamycin og trimethoprim. Videre ga tobramycin, sulphamethoxazole trimethoprim, oxacillin og gentamicin en liten diffusjonssone for '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' og *Pasteurella skyensis*. For antibiotikumet meropenem var det kun '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' isolatet som fikk en liten sonestørrelse. For ampicillin var det kun '*Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*' som en mindre sonestørrelse på henholdsvis 19 mm. Clindamycin var det eneste antibiotikumet som ga en sonediameter på 0 mm for alle de isolatene.

Tabell 3.8: Tabell viser agardiffusjons resultater for isolatene 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' (VIB 3624), 'Pasteurella atlantica gv. cyclopteri' (VIB 5284) og Pasteurella skyensis (VIB 3624). Resultatet er oppgitt i millimeter av sonediameter. Sonestørrelser  $\leq 14$  mm er farget rødlig, 15-19 mm er farget gul og sonestørrelser  $\geq 20$  er ikke farget.

Antibiotikum	'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' (Diameter i mm)	'Pasteurella atlantica gv. cyclopteri' (Diameter i mm)	Pasteurella skyensis (Diameter i mm)
Ampicillin	25	31	33
Neomycin	13	19	13
Chloramphenicol	46	48	42
Pencillin G	31	33	26
Amoxycillin clavulansyre 2:1	35	40	33
Cefotaxime	47	43	40
Clindamycin	0	0	0
Tobramycin	14	26	17
Sulphamethoxazole trimethoprim	0	30	12
Nitrofurantoin	39	52	45
Fusidic acid	27	28	24
Erythromycin	33	37	24
Tetracycline	37	38	28
Cefoxitin	28	35	32
Nalidixic acid	30	35	32
Polymyxin	30	29	30
Oxacillin	0	24	19
Florfenicol	43	40	40
Ceftazidime	32	33	22
Ciprofloxacin	40	44	39
Gentamicin	17	24	19
Meropenem	12	36	26
Trimethoprim	0	15	0
Ampicillin	31	19	26
Cephalexin	30	33	30

### 3.4.1 Sensitivitetsforskjeller innad i taksonomiske grupper av 'P. atlantica gv. salmonicida' og 'P. atlantica gv. cyclopteri'

For å undersøke om det foreligger sensitivitetsforskjeller mellom forskjellige bakteriestammer av 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' og 'Pasteurella atlantica gv. cyclopteri' ble det gjort en agardiffusjonstest for 12 utvalgte antibiotika. De utvalgte antibiotika ble valgt på bakgrunn av resultatene fremvist i tabell 3.8 og dets enkelte antibiotikas virkemekanisme.

Resultater fra diffusjonstesting for ulike stammer av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* kan sees i Appendiks I. *P. atlantica* gv. *salmonicida* viser forholdsvis liten sensitivitet for antibiotikumene neomycin, clindamycin og oxacillin. For neomycin og clindamycin var det kun isolatet VIB 3642 som ga en hemmingssone over 15 mm. Videre var det for gentamicin, sulphamethoxazole trimethoprim (Sulph. Trim) og tobramycin jevnt over liten sonediameter, med unntak av enkelte stammer. VIB 3624 var lite sensitiv for meropenem, mens de andre stammene viste stor grad av sensitivitet for antibiotikumet. For ampicillin, fusidic acid, erythromycin og ceftazidime ble det det bare funnet sonediameter av medium eller stor størrelse og variasjonsbredden mellom stammene var forholdsvis liten (Tabell 3.9).

Tabell 3.9 viser gjennomsnittsberegninger, standardavvik, median, min-verdi, maks-verdi og variasjonsbredden av sonediameterstørrelsen til hvert enkelt antibiotika testet på isolater av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*.

Tabell 3.9: Viser gjennomsnittsberegninger (Gj.snitt), standardavvik (Std.av), median, minimumverdi (Min), maksimumverdi (Maks) og variasjonsbredde (Var.bred) for sonediameter hos de ulike isolater av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* mot hvert enkelt antibiotikum.

Antibiotikum	Gj. snitt	Std.av	Median	Min	Maks	Var. bred
Neomycin	13	1,8	13	9	17	7
Clindamycin	4	6,5	0	0	16	16
Tobramycin	16	1,6	16	14	20	6
Sulph.trim	15	11,6	16	0	34	34
Oxacillin	3	6,4	0	0	16	16
Gentamicin	16	1,6	16	14	20	6
Meropenem	38	9,7	40	12	49	37
Trim.thoprim	16	10,9	20	0	29	29
Ampicillin	34	2,1	34	31	38	7
Fusidic acid	28	2,0	27	25	32	7
Erythromycin	36	3,5	36	31	42	11
Ceftazidime	34	3,7	32	28	39	11



Resultater fra agardiffusjonstesting av ulike stammer av *'Pasteurella atlantica gv. cyclopteri'* er fremvist i Appendiks II. Alle stammer viste resistens eller forholdsvis nedsatt følsomhet for clindamycin (Tabell 3.10, Appendiks II). For oxacillin ble det også sett mindre soner hos alle stammer, med gjennomsnittsdiameter på 21, og en relativt lav variasjonsbredde på 7. For de resterende testede antibiotikum ble det ikke sett en nedsatt følsomhet for alle stammer. Det var kun sett enkeltstammer som hadde nedsatt sensitivitet for et fåtall antibiotika: trimethoprim og ampicillin ga kun soner av liten størrelse hos bakterieisolatet VIB 5284 (Appendiks II).

Tabell 3.10 viser gjennomsnittsberegninger, standardavvik, median, min-verdi, maks-verdi og variasjonsbredden av sonediameterstørrelsen til hvert enkelt antibiotika testet på isolater av *'Pasteurella atlantica gv. cyclopteri'*.

Tabell 3.10: Viser gjennomsnittsberegninger (Gj.snitt), standardavvik (Std.av), median, minimumverdi (Min), maksimumverdi (Maks) og variasjonsbredde (Var.bred) for sonediameter hos de ulike isolater av *'Pasteurella atlantica gv. cyclopteri'* mot hvert enkelt antibiotikum.

Antibiotikum	Gj. snitt	Std.av	Median	Min	Maks	Var.bred
Neomycin	20	1,1	19	18	21	3
Clindamycin	9	9,6	10	0	22	22
Tobramycin	24	2,2	23	21	27	7
Sulph.trim	32	4,2	33	22	36	14
Oxacillin	21	1,9	21	17	24	7
Gentamicin	23	1,3	23	20	25	4
Meropenem	42	4,2	42	36	47	12
Trimethoprim	29	6,6	29	15	39	25
Ampicillin	37	6,7	39	19	44	24
Fusidic acid	28	1,2	28	25	30	5
Erythromycin	37	2,3	37	32	41	9
Ceftazidime	37	2,1	37	33	40	7

### 3.5 Biofilmdannelse i kunstig og autoklavert sjøvann

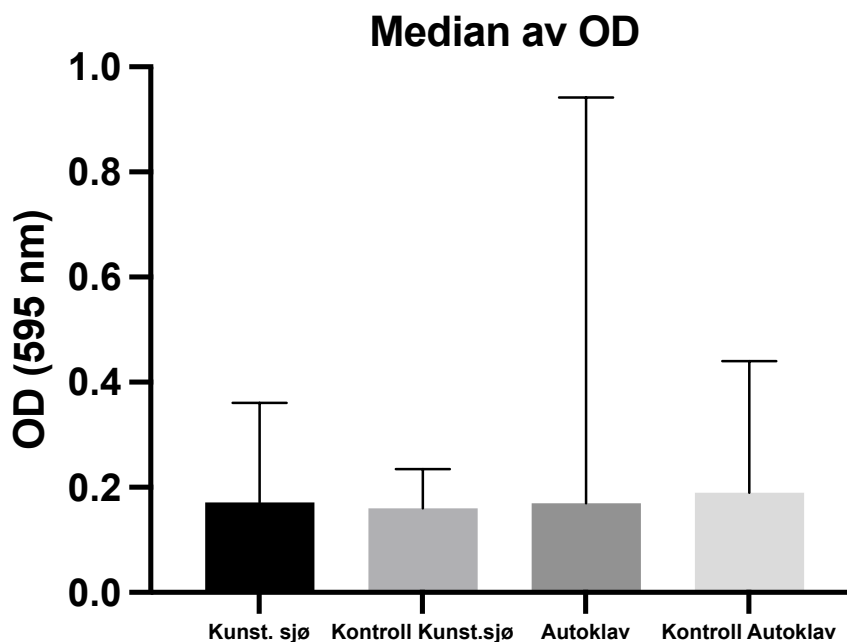
*'Pasteurella atlantica gv. salmonicida'* (VIB 3624) ble inkubert i 96 brønns mikrotiterplater med formål om å undersøke dens evne til biofilmdannelse i kunstig sjøvann og filtrert og autoklavert sjøvann. Det ble funnet at medianverdi til prøvebrønner med kunstig sjøvann var

0.11 høyere enn korresponderende kontrollbrønner noe som kan indikere svak biofilmdannelse. For bakteriene som var inkubert i filtrert og autoklavert sjøvann ble det ikke funnet noen indikasjon på biofilmdannelse. For brønnene med ikke-autoklavert sjøvann ble det funnet biofilmdannelse.

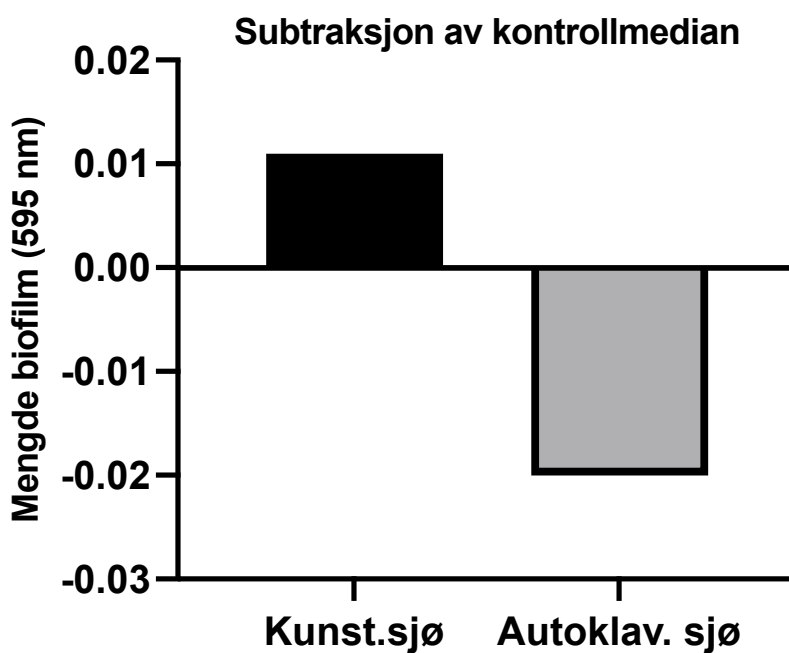
Prøvebrønner med bakteriesuspensjon inokulert i kunstig sjøvann ga 0.171 i absorbans ved måling på 595 nm (Figur 3.16). Median av de tilhørende 40 kontrollbrønnene ble funnet å være 0.160. Ved å subtrahere medianen av prøvebrønnene mot median av kontroll gir det 0.11 (Figur 3.17)

For autoklavert og filtrert sjøvann ble median absorbans funnet å være 0.170 (Figur 3.16). Median av de tilhørende kontrollbrønnene var 0.19. Etter subtraksjon av kontrollbrønnene gir dette -0.02 (figur 3.17).

Tettheten i den inokulerte TSBSS kulturen som ble brukt i biofilmforsøket hadde en OD på 0.168 når den ble høstet. I henhold til tabell 3.1 tilsvarer dette en omtrentlig dyrkbar tetthet på  $3.2 \times 10^8$  CFU/ml, noe som da gir en sluttkonsentrasjon på  $4.6 \times 10^7$  i hver brønn (25  $\mu$ l bakteriekultur i 150  $\mu$ l vann). Det ble gjort utstryk fra tilfeldige brønner på dag 3 og 6 i inkubasjonstiden. Kontroll av bakterieveksten bekreftet renkultur med '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og at bakterien fortsatt var dyrkbar i undersøkte brønner. Det ble ikke funnet vekst av kontaminanter.



Figur 3.16: Viser median av OD-målinger ved 595 nm for henholdvis kunstig sjøvann (Kunst. Sjø), Kontroll kunstig sjøvann (Kontroll Kunst. Sjø), Autoklavert og filtrert sjøvann (Autoklav) og Kontroll autoklavert og filtrert sjøvann (Kontroll Autoklav). Grafen inkluderer grener som viser range (høyeste – laveste verdi),



Figur 3.17: Viser mengde biofilm fra 'Pasteurella atlantica gv. salmonicida' i kunstig sjøvann (Kunst. Sjø) og autoklavert og filtrert sjøvann (Autoklav. Sjø) etter å ha subtrahert median av kontroll fra median av prøvebrønner. Positiv verdi viser at biofilm er tilstede. Negativ verdi viser at det ikke ble funnet biofilm

## 4 Diskusjon

'*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' forårsaker store tap og velferdsproblemer i norsk oppdrettsnæring og er en betydelig biosikkerhetsrisiko. Til tross for dette vet vi ingenting om hvor lenge bakterien overlever i sjøvann. I denne studien er det gjennomført mikrokosmeforsøk hvor det ble funnet at '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' sannsynligvis overlever forholdsvis kort tid i miljø *in vitro*. I forsøket ble det nyttet naturlig sjøvann som ikke var filtrert eller behandlet. Fordelen ved å nytte ubehandlet sjøvann er at en så langt det er mulig gir et representativt bilde for de påvirkningsforhold som bakteriene møter i det naturlige miljø. Likevel er det en del faktorer i det naturlige miljø som en ikke klarer å simulere i mikrokosmer. Eksempelvis kan vannutskiftning, tilstrøm av næringsstoffer og naturlig variasjon av kohabiterende mikroorganismer tenkes å være viktige elementer som spiller inn på bakteriens overlevelsessevner, som er vanskelig å replikere. Vi ønsket å kartlegge hvor lenge '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' overlever i miljø, fordi dette kan gi viktig kunnskap knyttet til biosikkerhet og smittespredning av pasteurellose.

Innledningsvis var det ønskelig å kartlegge vekstdynamikken til '*P. atlantica* gv. *salmonicida*', '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' og *P. skyensis* slik at en i videre arbeid kunne høste bakterier mens de fremdeles var i eksponentiell vekstfase. Dette ble gjort ved å inokulere bakteriene i TSBSS og gjøre målinger av OD. I forsøket ble det sett at *P. skyensis* hadde den høyeste dyrkbare tettheten gjennom hele inkubasjonsperioden og nådde platånivå tidligere enn '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. Det lyktes derimot ikke å få vekst utover 2 timer i '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' kulturen, og kulturen var heller ikke dyrkbar etter 20 timer. Som følge av dette ble det gjort to nye forsøk på å dyrke opp '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' med et nytt batch-nummer av TSBSS for å undersøke eventuelle defekter i dyrkningsmediet. Til tross for dette lyktes det ikke å påvise en økning i dyrkbar tetthet for '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*'.

Det er usikkert hva som er årsaken til at det ikke lyktes å få vekst av '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' i TSBSS-kulturen. Det ble ikke funnet intakte bakterier under mikroskopering av gram-farget preparat fra TSBSS-kulturen. Vekstforutsetningene i TSBSS burde være gode for bakterien, da det har vært vist vekst av samme bakterie i TSBSS. I en studie av *Pasteurella* sp. isolert fra rognkjeks, ble det gjennomført vekstforsøk med TSB hvor ulike mengder FBS (I artikkelen beskrevet som FCS) ble testet for å finne den optimale tilsetningsprosenten (Ellul et al. 2018). I det forsøket ble det funnet at den optimale FBS-prosenten var 10 %; samme konsentrasjon

som ble nyttet i TSBSS kulturen i dette studiet. Ved en FBS tilsetning på 10 % ble det i den tidligere studien funnet at *Pasteurella* sp. isolatet fra rognkjeks oppnådde platånivå etter 20 timers inkubasjon, noe som samsvarer med hva som ble sett i TSBSS kulturene med '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og *P. skyensis* isolatene i denne studien (Ellul et al. 2018). En sannsynlig årsak til at det ikke lyktes å få en vesentlig oppformering av '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' i TSBSS kan være at en latent profag har blitt aktivert, og har produsert bakteriofager som har ført til lysis av *Pasteurella*-cellene i kulturen. I en tidligere publisert studie ble det gjennomført helgenomsekvensering av to '*Pasteurella atlantica*' fra rognkjeks der *in silico* analyser avdekket tilstedeværelse av 5 profager som var anslått å være intakt (Ellul et al., 2021). For å avgjøre hvorvidt det var en aktivering av profager med et påfølgende bakteriofag mediert drap av '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' som var årsaken til vekstproblemene i TSBSS kreves det videre arbeid. Det ble vurdert å gjennomføre elektronmikroskopi av bakteriekulturen, men som følge av utilstrekkelig tid ble dette dessverre ikke gjennomført. Skulle det avdekkes at vekstproblemene skyldes aktivering av latente profager ville det vært nyttig å undersøke hvilke faktorer som førte til at profagen ble aktivert med tanke på utvikling av potensielle biosikkerhets- og saneringstiltak. Dette ville også vært av kommersiell nytte da det er interesse for bakteriofag-terapi mot de fiskepatogene *Pasteurella* som virkemiddel i sykdomsbekjempelse. Det er gjort store fremskritt i syntetisk biologi, noe som muliggjør at en i større grad potensielt kan nytte temperate bakteriofager til terapeutiske formål (Monteiro et al., 2019). Eksempelvis kan genredigering av temperate bakteriofager ved bruk av CRISPR-Cas redusere vertscellens virulens, drepe vertscellen eller redusere dens tallrikhet, noe som er vist med gode resultater i forsøk både *in vitro* og *in vivo* (Nale et al., 2016; Park et al., 2017).

I mikrokosmeforsøket ble det funnet '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' ikke var dyrkbar i lang tid i naturlig sjøvann. For alle inkubasjonstemperaturer var utstryk gjort etter to døgns inkubasjon, den siste gangen det lyktes å finne dyrkbare kolonier av bakterien. Til tross for dette er det trolig at '*P. atlantica*' var dyrkbar noe lenger ved 4 °C, ettersom den dyrkbare tettheten etter 2 døgns inkubasjon fortsatt var relativt høy, sammenlignet med hva som ble sett for 10- og 15 °C mikrokosmene. Ved qPCR-analyse ble det sett en tilsvarende trend, med et hurtig frafall av antall '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' genomekvivalenter ved høyere inkubasjonstemperatur, samtidig som 4 °C viste en mer gradvis reduksjon. Likevel ble det for alle temperaturer, og gjennom hele forsøksperioden, funnet positive qPCR resultat for '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'.

Det er gjort flere mikrokosmeforsøk for å studere miljøoverlevelse hos fiskepatogene bakterier, hvor det ved ulike analysemetoder tilsynelatende er påvist tilstedeværelse av bakterier etter at bakteriene sluttet å være dyrkbar (Deere et al., 1996; Duodu & Colquhoun, 2010; Effendi & Austin, 1994; Stanley et al., 2002). Det er kan være flere årsaker til dette. Eksempelvis kan intakt DNA fra døde celler gi utslag i PCR analyser, døde celler kan farges og oppfattes som levende ved epifluorescens-mikroskopi, og IFAT eller ELISA kan binde antistoff til døde eller delvis intakte celler (Morgan et al., 1991; Rudi et al., 2005; Stanley et al., 2002). Etersom mengden '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' tilført mikrokosmene ga en relativt høy dyrkbar tetthet i starten av forsøket (se tabell 3.2), samtidig som det ble observert et raskt frafall av dyrkbare kolonier (se figur 3.7) kan akkumulasjon av frittflytende DNA, og DNA fra intakte døde celler ha forårsaket de positive qPCR analysene gjennom hele forsøket. En annen mulighet er at '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' bakteriene gikk inn i en levende men ikke-dyrkbar (VBNC) livsform. For å påvise at bakterier entret VBNC må bakterien være intakt, ikke gjennomgå celledeling og samtidig vise metabolsk aktivitet (Colwell, 2000). Etersom det ikke ble gjennomført VBNC-bekreftende undersøkelser i dette studiet er det ikke mulig å avgjøre hvorvidt det er VBNC som har gitt positive qPCR analyser i mikrokosmeforsøket. Mikroskopiavhengige VBNC undersøkelser ville trolig også vært utfordrende, da det ville vært vanskelig å skille *Pasteurella* cellene fra resten av de kohabiterende bakteriene i mikrokosmen. En annen mulighet ville vært å forlenget forsøksperioden for å se om qPCR-analysene ville blitt negative med tid. qPCR-analyser fra mikrokosmene ble gjort i etterkant av forsøket da det av praktiske årsaker ikke var tid til å gjøre dyrkning, telling, MALDI-TOF analyse, rensing og qPCR analyse i sanntid. Om en forlenget forsøket og fortsatt så positive og stabile qPCR analyser over tid, samtidig som bakterien ikke var dyrkbar, ville dette vært en enda sterkere indikator på at bakteriene hadde entret VBNC. Likevel virker det mer sannsynlig at bakteriene faktisk døde, enn å ha entret VBNC, ettersom det ble sett en relativt hurtig nedgang av genomekvivalenter ved qPCR-analyse.

For fremtidig arbeid anbefales det derfor å repetere forsøket over en lenger tidsperiode og i tillegg gjennomføre VBNC undersøkelser i sterile mikrokosmer. Det er gjort flere mikrokosmeforsøk der fiskepatogene bakterier ble vurdert å ha entret VBNC (Duodu & Colquhoun, 2010; Effendi & Austin, 1994; Morgan et al., 1991). Den epizootologiske relevansen til VBNC kan likevel diskuteres. I smitteforsøk gjort av Stanley et al. (2002) ble det bare ved dyrkbarhet funnet en korrelasjon med virulens for *A. salmonicida* (Stanley et al., 2002). Dette ble videre forsterket av smitteforsøk med VBNC celler av *F. noatunensis* hvor det

heller ikke lyktes å fremkalle sykdom (Duodu & Colquhoun, 2010). Fra et epizootologisk perspektiv virker det derfor mer relevant å fokusere på vekstdynamikken til kolonidannende enheter over tid.

Ved qPCR analyse fra kontroll-mikrokosmene var det for noen prøver funnet positive analyseresultat. Av de positive analysene var det i hovedsak svært lite genomisk materiale tilstede i prøvene (Ct-verdier over 35), men tre av prøvene ga Ct-verdier på 29-30 (se tabell 3.5). Det er usikkert hva som har forårsaket de positive analysene, og operatørfeil ved prøveuthenting, filtrering, ekstraksjon av DNA eller qPCR-analyse kan ikke utelukkes. Alle negative-internkontroll brønner (NTK) ved qPCR-analysene var negative. En mulig årsak kan være en metodefeil i filtreringen. Når vannprøvene ble filtrert med den peristaltiske pumpen gjennom filterkoppene ble nitrocellulosefiltrene byttet mellom hver prøve ved bruk av engangs pinsetter. Dette ble gjort som et kostnadsbesparende tiltak, på bakgrunn av kostnaden per filterkopp og mengden av prøver som skulle filtreres. I underkant av nitrocellulosefiltrene var det en membran som ikke ble byttet mellom prøvene, og som etter hvert ble fuktig. En mulig forklaring er at noe genomisk materiale, eksempelvis fritt DNA fra døde bakterier, passerte nitrocellulosefilteret og festet seg til membranen og på den måten kom i kontakt med kontrollfilterene. Denne svakheten i oppsettet ble avdekket før filtrering av vannprøver fra mikrokosmer inkubert ved 4 og 10 °C og hele filterkoppene ble byttet jevnligere for å unngå at membranen ble fuktig. Dette kan i så fall forklare hvorfor de laveste Ct-verdiene ble sett for mikrokosmene inkubert ved 15 °C. En mindre sannsynlig forklaring er at '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' var naturlig til stede i inntaksvannet og på den måten er kommet i kontrollmikrokosmene. Holmeset (2022) samlet vannprøver fra flere tilfeldige steder i PO 3 og PO 4 og gjorde qPCR analyse mot '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' for å karlegge dens naturlige forekomst og ingen av de innsamlede vannprøvene ga positivt analyseresultat. Det virker derfor usannsynlig at vann hentet fra 127 meters dyp i byfjorden i Bergen skal inneholde naturlig forekommende '*Pasteurella atlantica*'.

I vekstforsøk 1 og 2 ble det funnet en god korrelasjon mellom OD-målinger og antall CFU og forsøket virker å være replikerbart. Resultatene fra forsøket (tabell 3.1) ble brukt til å beregne mengden TSBSS kultur som måtte renses og tilføres hver mikrokosme for å oppnå den ønskede dyrkbare tettheten på 1 million CFU/ml i hver mikrokosme. Utstryk fra første dag av mikrokosmeforsøket (Tabell 3.2) viser en faktisk dyrkbar tetthet som er vesentlig lavere enn det som var beregnet. Det er flere årsaker som kan ha forårsaket diskrepansen mellom faktisk

og beregnet CFU/ml i mikrokosmene. En mulig årsak kan være at vaskeprosessen hvor TSBSS ble fjernet var suboptimal, og førte til død eller frafall av bakterier som følge av pipettering av væske mellom hver sentrifugering. Ved uttak til qPCR-analyse i vekstforsøk 1 og 2, ble en lignende metode brukt (avsnitt 2.8.2), og fra qPCR-analysene ble det også funnet dårlig korrelasjon mellom forsøkene (figur 3.4). Videre sees det for mikrokosmene inkubert ved 15 °C at det er store forskjeller i dyrkbar tetthet mellom triplikatene (tabell 3.2). Forskjellen skyldes trolig for dårlig risting av mikrokosmene etter at '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' bakteriene ble tilført mikrokosmene. Avvik mellom beregnet og faktisk dyrkbar tetthet hos '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' dyrket opp i TSBSS er beskrevet av Holmeset (2022) der flokkulering i kontakt med vann som følge av bakterienes hydrofobe overflate fremheves som en mulig forklaring. Ellul (2021) beskriver også flokkulering i flytende vekstmedium i tidlig vekstfase hos '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*'.

I mikrokosmeforsøket ble det funnet at miljøoverlevelsen til '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' trolig er temperaturavhengig ettersom både dyrkning og qPCR analyse, viste at frafallet av bakterier gikk saktere ved lavere temperaturer (4 °C). Dette skyldes trolig at de metabolske prosessene går saktere ved lave temperaturer, og den samme temperaturavhengigheten er observert i andre mikrokosmeforsøk (Duodu & Colquhoun, 2010). Likevel ble det for alle temperaturer funnet at dyrkbarheten til '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' er kort i naturlig sjøvann. Det ville derfor vært interessant å implementere resultatene fra dette forsøket i smittemodelleringer. På den måten ville en fått et teoretisk anslag for smittepotensialet over ulike avstander, der en eksempelvis kunne undersøkt sannsynligheten for vannbåren smitte av pasteurellose mellom to ulike anlegg. Bakterier i *Pasteurellaceae* familien isoleres i hovedsak fra infisert vev, blod og fra mucosa (Christensen et al., 2014). Det kan derfor tenkes at tilgjengelighet av slike næringsstoffer er en viktig faktor for miljøoverlevelsen til '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. For videre arbeid ville det derfor være interessant å studere miljøoverlevelse i mikrokosmer med vann hentet fra oppdrettsanlegg eller avlusningsenheter. Ved å inkubere bakterien i et miljø hvor mucus, feces, blod, skjell og andre næringsstoffer er til stede, ville en reell oppdrettssituasjon simuleres enda bedre. Ettersom det i denne studien er funnet at '*Pasteurella atlantica*' er dyrkbar i kort tid når den inokuleres i naturlig sjøvann, anbefales det for fremtidige mikrokosmeforsøk å gjøre hyppigere uttak til CFU bestemmelse i de første dagene av forsøket. På den måten vil en få et enda bedre datagrunnlag for frafallet av dyrkbare kolonier. Bakterien er også avhengig av salt for å vokse, og hvilke effekter forskjellige saliniteter har på overlevelse ville vært interessant for et videre arbeid.



En annen årsak til den korte overlevelsen i naturlig sjøvann kan være kohabiterende mikroorganismer som hemmet vekst av '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*'. Det ble gjort en undersøkelse av veksthemming (se avsnitt 3.3.4), hvor 18 kolonityper ble sådd opp på BAS skåler med teppevekst av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og det ble ikke funnet soner som viste hemming av vekst. Det ble gjort MALDI-TOF analyse hvor det ble funnet flere treff for *Vibrio splendidus* og ett treff for *Shewanella marinintestina* på artsnivå (se tabell 3.4). Innad i både *Shewanella* og *Vibrio* genuset er det bakteriearter som er funnet å kunne hemme kohabiterende mikroorganismer. *Vibrio cholera* er vist å drepe både eukaryote og prokaryote celler ved sekresjon av toksiner (Basler et al., 2012; Pukatzki et al., 2006). En stamme av *Shewanella putrefaciens*, SpPdp11, er vist å virke antagonistisk på noen isolater av *Vibrio (Listonella) anguillarum* og bakterien fremheves som et potensielt probiotikum (Cámara-Ruiz et al., 2020; Chabrillón et al., 2006). Likevel kan det være en rekke andre mikroorganismer tilstede i mikrokosmene som kan ha en inhiberende virkning på '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. Det har lenge vært kjent at kun et fåtall av de mikroorganismene som finnes i miljøet er dyrkbar, og i vannprøver er der funnet store forskjeller hva gjelder antall celler mellom direktemikroskopi og telling av kolonier på agarskål (Jannasch & Jones, 1959; ZoBell, 1941). Derfor kan ikke inhibisjon fra kohabiterende bakterier utelukkes, ettersom det kan være veksthemmende bakterier tilstede i mikrokosmene som ikke lar seg dyrke på BAS eller MA-skåler.

For å kartlegge de kohabiterende bakteriene i mikrokosmene ble det gjort MALDI-TOF analyser av over 250 forskjellige bakteriekolonier som ikke var forenlig med *Pasteurella*. For de fleste koloniene kunne ikke MALDI-TOF analysen gi et sikkert resultat ettersom den ikke fant treff for bakterien i databasen. De bakterieartene som ga treff på artsnivå var *Vibrio splendidus* (se tabell 3.3) i tillegg til *Shewanella marinintestina* i MALDI-TOF analysene gjort i forbindelse med veksthemming (se avsnitt 3.3.4). I begynnelsen av mikrokosmeforsøket ble det ved utstryk på BAS og MA kun funnet vekst av et fåtall kolonier som ikke var '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. Etterhvert som mengden *Pasteurella* bakterier begynte å falle ble det for alle inkubasjonstemperaturer registrert en økning av andre kolonityper (Se figur 3.8, figur 3.9, figur 3.10). En mulig årsak til økningen kan være vekst av opportunistiske bakterier som tilegner seg næring fra døende *Pasteurella* bakterier. Dette stemmer godt overens med vekststagnasjonen av andre bakteriekolonier sett for 10 °C mikrokosmene (figur 3.9) og reduksjonen hos 15 °C (figur 3.10), noe som kan skyldes at næringsgrunnlaget i mikrokosmen etterhvert ble brukt opp. En lignende økning ble også registrert i 4 °C mikrokosmen (figur 3.8), men der fortsatte veksten

av andre arter på MA skålene gjennom hele forsøksperioden. Den forsinkede veksten kan muligens forklares av tregere metabolisme som følge den lave temperaturen.

Det ble gjort sensitivitetsundersøkelser mot en rekke antibiotikum for isolater av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*', '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' og *P. skyensis* med formål om å utvikle en selektiv agar. '*Pasteurella atlantica*' bakteriene er saktevoksende (Alarcón et al., 2016), og dens vekst vil kunne kamufleres av mer hurtigvoksende bakterier ved direkteutstryk i felt. Det er gjort arbeid parallelt ved Veterinærinstituttet i Bergen, der qPCR-analyser fra avlusningsfartøy har gitt positive analyseresultat for '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' i forkant og etterkant av gjennomførte behandlinger, samtidig som det ikke har lyktes å dyrke bakterien opp på agarskål (D. Colquhoun, pers. kom., 2023). Det er derfor av interesse å undersøke levedyktigheten og den eventuelle virulensen til de *Pasteurella*-bakteriene som kan være til stede i etterkant av slike behandlinger, og for å muliggjøre dette er det behov for å kunne dyrke disse bakteriene. Til dette kan en bruke et flytende og selektivt vekstmedium for å prøve å få en oppformering av de få levende *Pasteurella*- bakterier som potensielt fortsatt er til stede. På den måten vil en i praksis bedre kunne vurdere om det er en reell smittefare med levende bakterier, eller bare genomisk materiale fra døde celler som er til stede. I mikrokosmeforsøket som er gjort i denne studien ville en også dratt nytte av en selektiv agar, ettersom det ble sett vekst av mer hurtigvoksende bakterier på BAS skåler som muligens kan ha kamuflert vekst fra *Pasteurella*. Et selektivt vekstmedium vil derfor kunne bedre diagnostikk i felt, gi kunnskap rundt smitterisiko og brukes i forskning. Derfor er det i denne studien gjort et grunnleggende arbeid for en videre utvikling av et selektivt vekstmedium.

I forsøket ble diffusjonssoner til kontrollisolater av *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (tabell 3.7) og *Staph. aureus* (tabell 3.6) kontrollert opp mot QC verdiene satt i VET04 rapporten (CLSI, 2020). En svakhet i kvalitetskontrollen er at det i VET04 nytttes MHA skåler mens det i dette forsøket ble nyttet blodagarskåler, etter normal praksis for sensitivitetsundersøkelser ved Veterinærinstituttet (D. Colquhoun, pers. kom., 2023). Til tross for agarforskjellen var alle sonestørrelser for *S. aureus* innenfor de QC- parameterne oppgitt i VET04, mens *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* viste et svakt avvik (< 3 mm) for tre ulike antibiotika. QC-parametre er utarbeidet for kvalitetssikring av diagnostikk hos mennesker og dyr, og et mindre avvik ansees for dette forsøket å være akseptabelt, særlig om en faktorerer inn forskjell i agartype. Resultatet av antibiogramundersøkelsen viser at neomycin, clindamycin og

trimethoprim var særlige aktuelle virkestoff for videre arbeid ettersom alle isolatene var resistente eller selektive mot dem (Tabell 3.8).

Det var ønsket å kartlegge eventuelle intrataksonomiske sensitivitetsforskjeller mellom de ulike stammene av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' for å forsikre at en potensiell agar vil virke mot et bredt spekter av bakteriestammer. Diffusjonstesting av ulike stammer '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*' viste at det i gjennomsnitt for testede stammer var nedsatt følsomhet mot neomycin, clindamycin, tobramycin, oxacillin, gentamicin og fusidic acid (Tabell 3.9, tabell 3.10). Gentamicin og neomycin er begge relativt bredspektervirkende aminoglycosideantibiotika som primært virker mot aerobiske gram-negative bakterier og mykoplasma (Prescott & Baggot, 1988). Clindamycin er i lincosamidesklassen av antibiotika, og virker særlig godt mot gram-positive bakterier og relativt godt mot anaerobiske gram-negative bakterier. Når clindamycin kombineres med aminoglycosideantibiotika, som gentamicin eller neomycin, virker de additivt eller synergistisk mot en rekke forskjellige bakterier (Prescott & Baggot, 1988). Både clindamycin og neomycin har vist å ha nedsatt virkning mot de ulike stammene av '*P. atlantica*', samtidig som de sammen ser ut til å ha en bred virkning mot en rekke ulike typer bakterier. Ved å kombinere neomycin og clindamycin er det sannsynlig å få hemmet vekst av aerobiske gram negative-bakterier, gram-positive bakterier, mykoplasma og relativt mange anaerobiske gram negative-bakterier. En ville da fått dekket et bredt spekter av bakterier som kan tenkes å hemme eller kamuflere vekst av '*Pasteurella atlantica*'. En mulig utfordring er likevel den synergistiske effekten som er beskrevet når neomycin og clindamycin administreres sammen. Til tross for at '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' har nedsatt følsomhet mot dem begge når de administreres separat, ville kanskje synergismen mellom de to antibiotikaene kunne hemme vekst av også '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. Clindamycin og aminoglycosider kombineres for eksempel i humanmedisin i behandling av blandingsinfeksjoner bestående av både gram-negative og gram-positive bakterier (Bartlett et al., 1981). I et videre arbeid ville det derfor være behov for å kartlegge om de to antibiotikaene i kombinasjon ikke bare ville hemmet vekst av bakgrunnsflora men også '*P. atlantica*'. Det vil være behov for fastsetting av MIC-verdier, og betydelig testing for å finne den riktige konsentrasjonsmengden som skal til for å optimalisere vekst av '*Pasteurella atlantica*'. For clindamycin ble det også funnet at variasjonsbredden var ganske stor mellom isolatene (tabell 3.9, tabell 3.10) og det kan derfor antas at den vil virke noe mer hemmende på enkelte isolater av '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*'.

I dette forsøket er det funnet at et lincosamid (clindamycin) og aminoglycosider (gentamycin og neomycin) er lovende antibiotika for utvikling av selektive agar mot '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' og '*P. atlantica* gv. *cyclopteri*'. For videre arbeid anbefales det å fastsette MIC verdier for de ulike stammene. Det anbefales videre å gjøre forsøk der ulike konsentrasjoner av de to klasser av antibiotika testes for å finne det optimale konsentrasjonsforholdet mellom dem. Det er også behov for å avklare hvorvidt synergismen mellom lincosamider og aminoglycosider vil hemme vekst av '*P. atlantica*'. Ettersom '*Pasteurella atlantica*'-bakteriene er saktevoksende, og lett kan kamufleres eller inhiberes som følge av kohabiterende mikroorgansimer er det sannsynlig at en selektiv agar vil forbedret diagnostisk arbeid i felt, og det anbefales derfor at dette jobbes videre med.

Det ble gjort innledende forsøk på evnen til biofilmdannelse hos '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. I forsøket ble det funnet at bakterien ikke var tydelig biofilmdannende i verken autoklavert eller kunstig sjøvann ved inkubasjon i 7 døgn ved 22 °C. Det ble også gjennomført biofilmforsøk der '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' ble inkubert i ikke-sterilt sjøvann. I biofilmstudie i ikke-sterilt sjøvann klarte en ikke å skille hvorvidt biofilm var dannet av *Pasteurella* eller kohabiterende bakterier. Derfor ble disse forsøkene ikke inkludert i denne oppgaven.

Metoden brukt for biofilmundersøkelser i denne studien er basert på Vestby et al. (2009) og resultatet tolkes ved å subtrahere median av prøvebrønner med kontrollbrønner. Om prøvebrønnene oppnår en høyere median enn hva kontrollbrønnene har i etterkant av OD-måling, vil dette da tolkes som biofilmdannelse. En svakhet ved denne tolkningen av resultater er at den ikke angir hvilke verdier som gir en tilstrekkelig statistisk signifikant forskjell i OD median til at en sikkert kan si at det har blitt dannet biofilm. I denne studien ble medianen av prøvebrønner funnet å være 0.011 høyere enn kontrollbrønnene ved inkubasjon i kunstig sjøvann. For brønnene med autoklavert og filtrert sjøvann var median av kontrollbrønnene 0.02 høyere enn hva den var for prøvebrønnene. På bakgrunn av en ikke signifikant forskjell i median av OD-måling blir det derfor konkludert med at det i dette forsøket ikke ble påvist biofilmdannelse hos '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'.

I Stepanović et al. (2007) ble det foreslått en standardisert metode for tolkning av spektrofotometriske resultater fra biofilmundersøkelser av *Staphylococci* i 96-brønnsmikrotiterplater, etter å ha observert stor variasjon i hvordan slike resultater tolkes. Metoden baserer seg på å gjøre en gjennomsnittsberegning av kontroll- og prøvebrønner for så å sette en cut-off verdi som er tre standardavvik over gjennomsnitt av kontrollbrønnene. Denne verdien vil så trekkes fra gjennomsnitt av prøvebrønnene og størrelsen på den gjenstående

verdien vil avgjøre graden av biofilmdannelse (Stepanović et al., 2007). Bruker en Stepanović et al. (2007) sin metode for å tolke resultatene fra dette studiet ville ikke den gjennomsnittlige tetthetsforskjellen mellom kontroll og prøvebrønner vært stor nok til å si at biofilm var påvist. Det betyr likevel ikke at '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' ikke kan være biofilmdannende.

Når bakterier ble høstet fra TSBSS kulturen for å inokuleres i brønnene ble det ikke gjennomført en vaskeprosess for å fjerne overflødig vekstmedium. Det ble gjort utstryk på BAS fra tilfeldige brønner på dag 3 og 6 i inkubasjonstiden hvor det ble funnet at bakterien fortsatt var dyrkbar. Faktorerer en inn at inkubasjonstemperaturen i tillegg var på 22 °C står dyrkbarheten i kontrast til det raske frafallet i dyrkbarhet som ble observert ved høyere temperaturer i mikrokosmeforsøket (se avsnitt 3.3.1). En forklaring på dette kan være at når den bakterieholdige TSBSS-kulturen ble blandet med vann i brønnene, fulgte det med tilstrekkelig næring fra TSBSS-kulturen til at bakteriene kunne overleve gjennom hele inkubasjonsperioden på en uke. I tillegg var vannet sterilt, og på den måten behøvde ikke de inokulerte '*P. atlantica* gv. *salmonicida*' bakteriene å konkurrere med andre arter om tilgang på næring. I sterilt vann sto bakteriene heller ikke i fare for å bli inhibert av kohabiterende bakterier. Det kan derfor tenkes at den manglende biofilmdannelsen skyldes at miljøforholdene i brønnene var så gode at bakteriene ikke hadde behov for å danne biofilm for å overleve. For videre arbeid ville det være interessant å undersøke hvorvidt en rensing av TSBSS kulturen er nok til å påvise biofilmdannelse med samme metode. Eventuelt kunne en også forlenget inkubasjonstiden slik at det overflødig mediet ble brukt opp. Det anbefales at en i videre arbeid bruker Stepanović et al. (2007) sin metode for tolkning av resultater, da denne metoden virker å gi et bedre grunnlag for tolkning av resultater.

Det er en rekke forhold en i videre arbeid kan teste for å undersøke biofilmdannelse hos '*P. atlantica* gv. *salmonicida*'. Eksempler på ulike parametere som ville vært interessant å undersøke er inkubasjon ved ulike temperaturer, saliniteter, tilgang på lys og næringstilgang. Ved en slik studie ville en opparbeidet viktig kunnskap om hvorvidt biofilmdannelse er en del av overlevelsesstrategien til '*P. atlantica* gv. *salmonicida*', og på den måten ville en fått viktig epidemiologisk kunnskap for bekjempelse av pasteurellose.

## 5 Konklusjon og videre arbeid

I denne studien er det resultater som tyder på at '*Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*' overlever kort tid i miljø, og at dens vannbårne smittepotensiale trolig er begrenset til forholdvis korte geografiske avstander. Videre er det vist at bakteriens overlevelse trolig er

temperaturavhengig, og at dens dyrkbarhet faller fort ved høyere temperaturer. I videre arbeid knyttet til miljøoverlevelse anbefales det at en undersøker muligheten for at bakterien entreer VBNC og at en gjennomfører eventuelle gjenopplivnings og smitteforsøk. I nye mikrokosmeforsøk anbefales det at en henter vann fra oppdrettsanlegg eller avlusningsenheter, da næringsinnholdet i dette vannet kan tenkes å forlenge bakteriens levetid.

I studien er det gjennomført antibiogram, med formål om å utvikle en selektiv agar. Fra dette arbeidet fremheves clindamycin og neomycin som særlig aktuelle antibiotika for videre arbeider. Til slutt er det gjort en begynnende biofilmundersøkelse hvor det ikke ble funnet dannelse av biofilm. For videre arbeid her anbefales det at en undersøker for en rekke flere parametere enn det som ble gjort i dette forsøket.

## 6 Referanseliste

- Alarcón, M., Gulla, S., Røsæg, M. V., Rønneseth, A., Wergeland, H., Poppe, T. T., Nilsen, H., & Colquhoun, D. J. (2016). Pasteurellosis in lumpsucker *Cyclopterus lumpus*, farmed in Norway. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.12366>
- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Magariños, B., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2006). Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00981.x>
- Bartlett, J. G., Louie, T. J., Gorbach, S. L., & Onderdonk, A. B. (1981). Therapeutic efficacy of 29 antimicrobial regimens in experimental intraabdominal sepsis. *Reviews of infectious diseases*. <https://doi.org/10.1093/clinids/3.3.535>
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G. P., Jensen, G. J., & Mekalanos, J. J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10846>
- Beyers, R. J. (1964). The Microcosm Approach to Ecosystem Biology. *The American Biology Teacher*. <https://doi.org/10.2307/4440732>
- Birkbeck, T. H., Laidler, L. A., Grant, A. N., & Cox, D. I. (2002). *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.01884-0>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New infections*. <https://doi.org/10.1016/j.nmi.2019.100622>
- Boukahil, I., & Czuprunski, C. J. (2015). Characterization of *Mannheimia haemolytica* biofilm formation in vitro. *Veterinary Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.012>
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan, A., & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish and Shellfish immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.029>
- Cámara-Ruiz, M., Balebona, M. C., Esteban, M. Á., & Moriñigo, M. Á. (2020). Probiotic shewanella putrefaciens (SPPDP11) as a fish health modulator: A review. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121990>
- Chabrillón, M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M. C., & Moriñigo, M. A. (2006). Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01400.x>

- Chiers, K., De Waele, T., Pasmans, F., Ducatella, R., & Haesebrouck, F. (2010). Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary Research*.  
<https://doi.org/10.1051/vetres/2010037>
- Christensen, H., & Bisgaard, M. (2018). Classification of genera of *Pasteurellaceae* using conserved predicted protein sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002860>
- Christensen, H., Kuhnert, P., Norskov-Lauritsen, N., Planet, P. J., and Bisgaard, M. (2014). the Family *Pasteurellaceae*. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 535-564. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1\\_224](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_224)
- CLSI. (2020). *CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. 3rd ed. CLSI supplement VET04.*
- Colwell, R. R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: A survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1007/PL00012151>
- Dalynn Biologicals, Simpson, C. A., Geornaras, I., Yoon, Y., Scanga, J. A., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2014). McFarland Standard. -For in vitro use only- Catalogue No. TM50-TM60 McFarland. *Journal of Food Protection*.
- De Ley, J., Mannheim, W., Mutters, R., Piechulla, K., Tytgat, R., Segers, P., Bisgaard, M., Fredriksen, W., Hinz, K. H., & Vanhoucke, M. (1990). Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-2-126>
- Deere, D., Porter, J., Pickup, R. W., & Edwards, C. (1996). Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb04333.x>
- Duodu, S., & Colquhoun, D. (2010). Monitoring the survival of fish-pathogenic *Francisella* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00973.x>
- Dyrehelseforskriften. (2022). Forskrift om dyrehelse (FOR-2022-04-06-631). Hentet fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2022-04-06-631>
- Effendi, I., & Austin, B. (1994). Survival of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in the marine environment. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00233.x>
- Egidius, E., Andersen, K., Clausen, E., & Raa, J. (1981). Cold-water vibriosis or 'Hitra disease' in Norwegian salmonid farming. *Journal of Fish Diseases*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1981.tb01143.x>
- Egusa, S., & Simidu, U. (1972). A Re-examination of the Fish-Pathogenic Bacterium that had been Reported as a *Pasteurella* Species. *Nippon Suisan Gakkaishi*.  
<https://doi.org/10.2331/suisan.38.803>



- Ellul, R. M., Kalatzis, P. G., Frantzen, C., Haugland, G. T., Gulla, S., Colquhoun, D. J., Middelboe, M., Wergeland, H. I., & Rønneseth, A. (2021). Genomic analysis of *Pasteurella atlantica* provides insight on its virulence factors and phylogeny and highlights the potential of reverse vaccinology in aquaculture. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061215>
- Ellul, R. M., Walde, C., Haugland, G. T., Wergeland, H., & Rønneseth, A. (2018). Pathogenicity of *Pasteurella* sp. in lumpsuckers (*Cyclopterus lumpus* L.). *Journal of fish diseases*, 42(1), 35-46. <https://doi.org/10.1111/jfd.12905>
- Erkinharju, T., Gulla, S., Svendsen, J. C., Grønbech, S., & Hansen, H. (2023). Helsestatusjonen hos rensefisk. *Fiskehelserapporten 2022*. Veterinærinstituttets rapportserie nr. 5a/2023. Hentet fra <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelserapporten-2022>
- Farkas, J., & Olah, J. (1984). Occurrence of *Pasteurella* and *Streptococcus* in sheatfish (*Silurus glanis* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Symposia Biologica Hungarica*.
- Fiskeridirektoratet. (2022). Akvakulturstatistikk: Total utsett av rensefisk i merd. Hentet 20/12 22 fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk>
- Fiskeridirektoratet. (2023). Produksjonsoversikt: Uttak av slaktet fisk 2023 (Produksjonsområde). Hentet 13/02 23 fra <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Biomassestatistikk/Biomassestatistikk-etter-produksjonsomraade>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Folkehelseinstituttet. (2023). Bruk av legemidler i fiskeoppdrett, 2001-2022. Hentet 15/2 23 fra <https://www.fhi.no/hn/legemiddelbruk/fisk/2021-bruk-av-legemidler-i-fiskeoppdrett2/>
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-139>
- Grave, K., Engelstad, M., Søli, N. E., & Håstein, T. (1990). Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during 1980-1988. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90323-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90323-F)
- Gulla, S., Nilsen, H., Olsen, A. B., & Colquhoun, D. J. (2020). Fiskepatogene *Pasteurella* i Norge. *Norsk Fiskeoppdrett*, 46-47.

- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., William Costerton, J., Moter, A., & Bjarnsholt, T. (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x>
- Hawke, J. P., Plakas, S. M., Minton, R. V., McPhearson, R. M., Snider, T. G., & Guarino, A. M. (1987). Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90231-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90231-6)
- Holmeset, M. G. (2022) Miljø-DNA påvisning av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*. Masteravhandling. *Universitetet i Bergen*. <https://handle.net/11250/2997599>
- Holt, G. (1970). Vibriosis (*Vibrio Anguillarum*) as an Epizootic Disease in Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*). *Acta Veterinaria Scandinavica*. <https://doi.org/10.1186/BF03547959>
- Hårstein, T., & Bullock, G. L. (1976). An acute septicaemic disease of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) caused by a *Pasteurella*-like organism. *Journal of Fish Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb03903.x>
- Jannasch, H. W., & Jones, G. E. (1959). Bacterial Populations in Sea Water as Determined by Different Methods of Enumeration. *Limnology and Oceanography*. <https://doi.org/10.4319/lo.1959.4.2.0128>
- Janssen, W. A., & Surgalla, M. J. (1968). Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.96.5.1606-1610.1968>
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce biofilm? In *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.005>
- Jin, H., Zhou, R., Kang, M., Luo, R., Cai, X., & Chen, H. (2006). Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.009>
- Jones, M. W., & Cox, D. I. (1999). Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family *Pasteurellaceae* - A case history. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*.
- Karlsen, E. (2016). *Yersinia ruckeri* isolert fra Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) i Norge. Karakterisering og innledende studier av biofilmdannelse. Masteravhandling. *Universitetet i Bergen*.
- Legård, B. K., & Strøm, S. B. (2020). Pasteurellosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Western Norway. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 40(4). 148-155.
- Levipan, H. A., Tapia-Cammas, D., Molina, V., Irgang, R., Toranzo, A. E., Magariños, B., & Avendaño-Herrera, R. (2019). Biofilm development and cell viability: An undervalued mechanism in the persistence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734267>

- Lim, C. H., & Flint, K. P. (1989). The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb04578.x>
- Madetoja, J., Nystedt, S., & Wiklund, T. (2003). Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00396-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00396-3)
- Microbiology., A. S. for, Bergey, D. H. (David H., & Breed, R. S. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (7th ed.) Williams & Wilkins Co. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848>
- Monteiro, R., Pires, D. P., Costa, A. R., & Azeredo, J. (2019). Phage Therapy: Going Temperate? *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.008>
- Morgan, J. A. W., Cranwell, P. A., & Pickup, R. W. (1991). Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1777-1782.1991>
- Myhr, E., Larsen, J. L., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M., & Hastein, T. (1991). Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.57.9.2750-2757.1991>
- Nale, J. Y., Spencer, J., Hargreaves, K. R., Trzypiński, P., Douce, G. R., & Clokie, M. R. J. (2016). Bacteriophage combinations significantly reduce *Clostridium difficile* growth *in vitro* and proliferation *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01774-15>
- Nilsen, H. K. (2020). Pasteurellainfeksjon hos laks. *Fiskehelse rapporten 2019*. Veterinærinstituttets rapportserie 5a/2020. Hentet fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2020/fiskehelse rapporten-2019>
- Nilsen, H. K., Colquhoun, D., & Gulla, S. (2023) Pasteurellose. *Fiskehelse rapporten 2022*. Veterinærinstituttets rapportserie 5a/2023. Hentet fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelse rapporten-2022>
- Norsk sjømatråd. (2022). Verdi norsk sjømateksport fordelt på art hittil i år. Hentet 13/02 23 fra <https://nokkeltall.seafood.no>
- Oliveira, V. H. S., Løkslett, H., Walde, C., Sommerset, I., Qviller, L., & Brun, E. (2023). Dødelighet i laksefiskproduksjonen. *Fiskehelse rapporten 2022*. Veterinærinstituttets rapportserie 5a/2023. Hentet fra: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelse rapporten-2022>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary*

Research. PMID: 11989739; PMCID: PMC226988

- Park, J., Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., & Seo, K. S. (2017). Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 7(1), 44929 <https://doi.org/10.1038/srep44929>
- Penesyán, A., Paulsen, I. T., Kjelleberg, S., & Gillings, M. R. (2021). Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *npj Biofilms and Microbiomes*. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2>
- Poppe, T., & Bergh, Ø. (1999). *Fiskehelse of fiskesykdommer*. Universitetsforlaget.
- Prescott, J. F., & Baggot, J. D. (1988). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Blackwell scientific publications.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
- Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S. M., & Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005>
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbase, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., & Christen, R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-416>
- Sager, M., Benten, W. P. M., Engelhardt, E., Gougoula, C., & Benga, L. (2015). Characterization of biofilm formation in *Pasteurella pneumotropixa* and *Actinobacillus muris* isolates of mouse origin. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138778>
- Sandlund, N., Rønneseth, A., Ellul, R. M., Nylund, S., & Sandlund, L. (2021). *Pasteurella* spp. Infections in Atlantic salmon and lumpsucker. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.13381>
- Shapiro, J. A. (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. In *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.81>
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., & Boone, J. G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus Americanus*) in Chesapeake bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1814-1815.1964>

- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Oliveira, V. H. S., Moldal, T., Bornø, G., Haukaas, A., & Brun, E. (2023). *Fiskehelsesrapporten 2022*. Veterinærinstituttets rapportserie nr. 5a/2023. Hentet fra <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelsesrapporten-2022>
- Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, Knudsen SW, Sengupta ME, Mak SST, Sigsgaard EE, & Hellstrom M. (2016). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial {eDNA} using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>
- Stanley, C., Hiney, M., Gilroy, D., Powell, R., Padley, D., & Smith, P. (2002). Furunculosis-inducing ability of microcosms seeded with *Aeromonas salmonicida* correlates with colony-forming ability but not with PCR and ELISA data. *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00856-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00856-0)
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS*. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- Strøm, S. B., & Nilsen, H. (2021). *Pasteurella skyensis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Western Norway. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 41(4), 160-168. <https://doi.org/10.48045/001c.31534>
- Valheim, M., Håstein, T., Myhr, E., Speilberg, L., & Ferguson, H. W. (2000). Varracalbmi: A new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00209.x>
- Vestby, L. K., Møretro, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. *BMC veterinary research*, 5, 1-6. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-20>
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>
- Yamaoka, M., & Kusuda, R. (1972). Etiological Studies on Bacterial Pseudotuberculosis in Cultured Yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the Causative Agent – I: On the Morphological and Biochemical Properties. *Nippon Suisan Gakkaishi*. <https://doi.org/10.2331/suisan.38.1325>
- Zhao, J., & Aoki, T. (1992). Plasmid profile analysis of *pasteurella piscicida* and use of a plasmid DNA probe to identify the species. *Journal of Aquatic Animal Health*. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1992\)004<0198:PPAOPP>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1992)004<0198:PPAOPP>2.3.CO;2)
- ZoBell, C. E. (1941). Studies on marine bacteria, I: the cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res*, 42–7

## Appendiks I

Viser diameter av diffusjonssoner i mm for ulike stammer av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*, testet for utvalgte antibiotikum. Sonestørrelser fra 0-14 mm er farget grønn, sonestørrelser fra 15 – 19 mm er farget rød, og sonestørrelser >19 mm er ikke farget.

Antibiotikum	VIB 3624	VIB 3131	VIB 3694	50- 3690	VIB 3763	VIB 3708	VIB 3687	VIB 3308	VIB 3642	VIB 3672	50- 2635
Neomycin	13	12	9	14	13	13	12	14	17	14	13
Clindamycin	0	14	0	11	0	0	0	0	16	0	0
Tobramycin	14	17	15	17	15	16	16	16	20	17	16
Sulph.trim	0	11	13	0	22	18	0	16	34	30	18
Oxacillin	0	15	0	16	0	0	0	0	0	0	0
Gentamicin	17	15	14	16	16	14	17	16	20	16	15
Meropenem	12	40	38	44	40	40	39	33	49	43	42
Trimethoprim	0	27	19	0	15	20	0	23	23	29	22
Ampicillin	31	33	32	34	35	34	31	32	38	35	34
Fusidic acid	28	32	26	26	26	27	25	26	29	30	28
Erythromycin	33	40	31	34	36	37	32	34	39	42	39
Ceftazidime	32	37	29	32	32	28	32	32	39	36	38

## Appendiks II

Viser diameter av diffusjonssoner i mm for ulike stammer av *Pasteurella atlantica* gv. *cyclopteri*, testet for utvalgte antibiotikum. Sonestørrelser fra 0-14 mm er farget grønn, sonestørrelser fra 15 – 19 mm er farget rød, og sonestørrelser >19 mm er ikke farget.

Antibiotikum	VIB 5284	50-164	50- 1365	50- 3004	VIB 3801	VIB 3802	VIB 1926	VIB 2702	VIB 543	VIB 2993	VIB 4016
Neomycin	19	21	19	21	21	19	21	19	18	19	21
Clindamycin	0	21	20	17	22	10	0	0	0	12	0
Tobramycin	26	27	23	22	25	21	22	22	22	23	26
Sulph.trim	30	36	34	33	30	34	27	35	32	22	36
Oxacillin	24	20	22	20	23	21	22	19	20	21	17
Gentamicin	24	23	23	22	25	20	22	23	22	23	23
Meropenem	36	47	36	41	45	43	42	47	41	37	43
Trimethoprim	15	34	35	26	39	25	29	33	25	29	31
Ampicillin	19	35	39	34	43	39	42	44	37	42	39
Fusidic acid	28	28	27	28	29	X	27	28	25	30	28
Erythromycin	37	36	32	37	41	38	37	36	35	39	35
Ceftazidime	33	37	36	39	38	36	36	39	35	40	38

### Appendiks III

Viser Ct-verdier etter qPCR-analyse fra alle dager av mikrokosmeforsøket.  
 Kontrollmikrokosme = «K», Mikrokosme 1 = «K1», Mikrokosme 2 = «K2» og  
 Mikrokosme 3 = «K3».

qPCR analyseresultat - Mikrokosmeforsøk						
Dag	4 grader celsius		10 grader celsius		15 grader celsius	
	Mikrokosme	Ct-verdi	Mikrokosme	Ct-verdi	Mikrokosme	Ct-verdi
0	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K1	23,86	K1	23,38	K1	25,43
	K1	23,4	K1	24,23	K1	25,02
	K1	23,49	K1	25,05	K1	24,14
	K2	24,49	K2	24,78	K2	26,74
	K2	23,49	K2	24,91	K2	27,28
	K2	24,59	K2	23,72	K2	27,85
	K3	23,35	K3	24,31	K3	25,94
	K3	23,56	K3	24,74	K3	26,13
K3	24,15	K3	23,99	K3	26,1	
2	K	No Ct	K	No Ct	K	29,63
	K	No Ct	K	No Ct	K	30,45
	K	No Ct	K	No Ct	K	29,7
	K1	24,79	K1	24,34	K1	25,68
	K1	23,15	K1	24,56	K1	24,91
	K1	24,59	K1	24,89	K1	27,53
	K2	24,15	K2	24,98	K2	24,79
	K2	24,04	K2	24,85	K2	25,02
	K2	23,96	K2	24,96	K2	24,97
	K3	24,24	K3	24,89	K3	25,19
	K3	24,35	K3	25,29	K3	25,05
	K3	24,07	K3	24,99	K3	24,36
4					K	No Ct
					K	36,77
					K	No Ct
					K1	26,63
					K1	25,91
					K1	27,1
					K2	25,45
					K2	24,32

					K2	27,16
					K3	26,23
					K3	30,05
					K3	26,2
<b>5</b>	K	No Ct	K	No Ct		
	K	No Ct	K	No Ct		
	K	No Ct	K	No Ct		
	K1	24,76	K1	25,49		
	K1	25,03	K1	25,74		
	K1	24,61	K1	25,05		
	K2	24,61	K2	24,89		
	K2	24,64	K2	24,53		
	K2	24,4	K2	26,65		
	K3	24,84	K3	26,17		
	K3	23,82	K3	27,87		
	K3	23,94	K3	25,65		
<b>7</b>	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K	No Ct	K	36,46	K	No Ct
	K	37,05	K	37,16	K	No Ct
	K1	24,69	K1	26,63	K1	33,44
	K1	24,82	K1	26,09	K1	34,15
	K1	24,39	K1	26,37	K1	34,89
	K2	25,3	K2	27,63	K2	33,36
	K2	25,28	K2	27,19	K2	34,62
	K2	24,5	K2	27,15	K2	35,38
	K3	24,43	K3	26,76	K3	34,73
	K3	23,81	K3	26,35	K3	33,71
	K3	24,29	K3	32,19	K3	35,09
<b>9</b>	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct
	K1	25,31	K1	28,87	K1	31,77
	K1	24,51	K1	27,04	K1	32,01
	K1	24,76	K1	27,98	K1	31,49
	K2	26,31	K2	28,65	K2	33,28
	K2	26,02	K2	28,15	K2	33,33
	K2	26,35	K2	29,27	K2	33,13
	K3	25,51	K3	29,12	K3	34,58
	K3	25,5	K3	28,24	K3	35,53
	K3	25,92	K3	29,57	K3	34,57
<b>14</b>	K	No Ct	K	36,59	K	36,21
	K	No Ct	K	No Ct	K	No Ct



	K	No Ct	K	35,35	K	No Ct
	K1	30,19	K1	34,46	K1	34,52
	K1	29,94	K1	34,55	K1	35,11
	K1	28,59	K1	34,73	K1	33,46
	K2	29,54	K2	32,57	K2	36,92
	K2	30,14	K2	32,6	K2	31,4
	K2	29,66	K2	31,97	K2	36,34
	K3	29,44	K3	34,38	K3	
	K3	30,02	K3	35,19	K3	37,47
	K3	29,49	K3	35,48	K3	35,93
<b>19</b>	K	No Ct	K	No Ct		
	K	No Ct	K	No Ct		
	K	No Ct	K	No Ct		
	K1	31,06	K1	33,61		
	K1	31,51	K1	34,66		
	K1	30,5	K1	33,95		
	K2	27,68	K2	31,94		
	K2	27,23	K2	31,48		
	K2	27,65	K2	30,15		
	K3	27,96	K3	34,57		
	K3	27,73	K3	34,01		
	K3	26,91	K3	33,67		