

**Eksperimentell smitte av grønngylt,
Symphodus melops, med *V.tapetis* - isolatene
CECT 4600, LP2 og NRP45**



Mastergradsoppgave i Havbruksbiologi

Lisbeth Sælemyr Harketstad



Institutt for Biologi
Universitetet i Bergen, Norge

Juli 2011

FORORD

Dette mastergradsstudiet er utført parallelt med arbeidet som ingeniør ved Havforskningsinstituttet. Arbeidet har vært knyttet til prosjekter som omhandler smittespredning mellom arter i marint oppdrett, og et samarbeidsprosjekt (støttet av AURORA-programmet) mellom Havforskningsinstituttet og Universitetet i Brest, hvor vi arbeidet med *Vibrio*-infeksjoner hos skjell og fisk, og mulig smitteoverføring mellom disse. Gjennom studiene av grønnngylt har vi avdekket et betydelig sykdomsproblem som resulterer i et uakseptabelt høyt forbruk av leppefisk. Resultatene vil forhåpentligvis bidra til at vi får bedre metoder og bedre rutiner for å kunne oppdage sykdommer hos leppefisk og resultere i en mer forsvarlig og bærekraftig bruk av leppefisk som rensefisk i oppdrett av laksefisk. Problemstillingen er særlig relevant for grønnngylt fordi oppdretterne registrerer en total dødelighet av nettopp denne arten i løpet av en produksjonssesong.

Jeg vil takke Havforskningsinstituttet for økonomisk støtte og et raust handlingsrom som har gjort studiene mulig. En rekke personer har bidratt i arbeidet, inkludert hele "teamet" i AURORA-prosjektet. Jeg vil takke Anne Grete Eriksen og Cecile Skår for hjelp og støtte med molekylærbiologiske metoder, Egil Karlsbakk for uvurderlig hjelp til statistikk, sekvenser og for korrekturlesinger, Ann Cathrine Einen og Kjetil Korsnes for konstruktive innspill og gode oppmuntringer under veis. Takk til Ingrid U. Fiksdal for hjelp med histologi, Hari Rudra og Rolf Hetlelid Olsen for røkting av fisk og gode praktiske råd, Nina Sandlund for korrekturlesing og Are Nylund for nyttige og kritiske gjennomganger av manuskriptet. Til slutt vil jeg spesielt takke min veileder ved Havforskningsinstituttet, Stein Mortensen, som har vært med å utforme oppgaven. Han har vært en fantastisk støtte, og har i hele masterperioden vært behjelpelig med alt fra prøveuttak til korrekturlesinger. Han har også laget forsiden til oppgaven.

Bergen, 30. juli 2011

Lisbeth Sælemyr Harketstad

SAMMENDRAG

I dag er bruk av leppefisk (Labridae) som rensefisk i oppdrett av laks den eneste anvendte metoden for fjerning av lakselus som ikke er forbundet med negative miljømessige konsekvenser. Bruk av villfanget leppefisk har variert, men har økt de siste årene på grunn av problemer med lakselus som utvikler resistens mot lusemidler. Dagens bruk av leppefisk er imidlertid ikke etisk akseptabel. Det er et kontinuerlig tap av leppefisk i merdene som ikke er fullt ut forstått. Tapene fører til et uakseptabelt, kontinuerlig, høyt forbruk av leppefisk. En av leppefiskartene som benyttes er grønnngylt (*Symphodus melops*). Flere tidligere arbeider tyder på at grønnngylt er særlig utsatt for sykdom forårsaket av *Vibrio*-bakterier. Funn av *Vibrio tapetis* (LP2) hos grønnngylt i Norge var det første funnet av denne bakterien hos fisk, og det første funnet av denne bakterien i Norge. I forsøkene som er beskrevet i denne oppgaven ble *V. tapetis* LP2 brukt som smittebakterie i en serie smitteforsøk med villfanget grønnngylt. I tillegg ble det brukt to *V. tapetis*-isolater fra skjell; referansestammen CECT 4600 fra teppeskjell (*Ruditapes philippinarum*) i Frankrike og NRP 45, isolert fra norske teppeskjell. Det ble utført tre smitteforsøk: Grønnngylt ble smittet med tre forskjellige doser LP2 ved bad og intraperitoneal injeksjon, for å bestemme den beste smittemetoden. Resultatene fra dette forsøket ga ikke helt konsistente resultater, men badsmitte med $>10^6$ CFU x ml⁻¹ ble vurdert som pålitelig metode og benyttet i videre forsøk. Neste forsøk ble utført for å studere temperaturens innvirkning ved smitte med LP2. Grønnngylt ble badsmittet med 10^7 CFU x ml⁻¹ ved 6, 9, 12 og 15 °C. Resultatene viste en trend til økt dødelighet ved stigende temperatur, og det ble påvist signifikant høyere dødelighet ved 15 °C enn ved 6 °C. I det tredje forsøket ble fisken i tillegg til *V. tapetis* LP2 smittet med CECT 4600 og NRP45. I dette forsøket ble kun LP2 reisolert fra døde fisk, mens CECT 4600 og NRP45 ikke ble reisolert. Resultatene tyder på at LP2 kan være patogen for grønnngylt. Dødeligheten var imidlertid ikke høyere i LP2-smittegruppene enn i de andre gruppene, og det ble både fra smitte- og kontrollgruppene isolert andre *Vibrio* spp og *V. tapetis* som ikke var identisk med smittebakteriene. Resultatene tyder derfor på at grønnngylt kan være bærer av *Vibrio*-bakterier, særlig *V. tapetis*- og *V. splendidus*-stammer, og lett utvikler sykdom forårsaket av disse bakteriene når de holdes i fangenskap. Forsøkene ble utført på forskjellig tid på året. Det var særlig høy dødelighet av hunner som var fanget inn i tiden rundt gyting. Dette tilsier at fisket etter grønnngylt bør unngås i gyteperioden. Resultatene i denne oppgaven kan brukes som en bakgrunn for videre studier av bakteriesykdommer hos villfanget leppefisk, bedre velferdssituasjonen hos leppefisk og på denne måten bidra til å oppnå en bærekraftig bruk av leppefisk i laksenæringen.

ABSTRACT

The use of wrasse (Labridae) as cleanerfish in salmonid aquaculture is the only method for removal of salmon lice that does not have any negative impact on the environment. The use of wild-caught wrasse has increased during the past few years due to increasing problems with salmon lice developing resistance to chemotherapeutica. The use of wrasse is not ethically acceptable, due to a continuous loss of wrasse in the salmon farms, resulting in an unacceptably high use of wrasse. One of the species used is the corkwing wrasse (*Symphodus melops*). Previous studies indicate that this species is susceptible to disease caused by *Vibrio* bacteria. Detection of *Vibrio tapetis* (LP2) in Norwegian corkwing wrasse was the first detection of this bacterium in fish and the first detection in Norway. In this Master thesis, *V. tapetis* LP2 was used in a series of challenge experiments with wild-caught corkwing wrasse. In addition to LP2, two other *V. tapetis* strains from clams were used; the reference strain CECT 4600 from Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) in France and NRP45, from Manila clams introduced in Norway. Three experiments were performed: Corkwing wrasse were challenged with three doses of LP2 by bath challenge and intraperitoneal injections in order to choose the better challenge method. The results were not consistent, but bath challenge with $>10^6$ CFU x ml⁻¹ was considered a reliable method, and applied in the following experiments. The next experiment was performed in order to study the effect of increasing temperature on LP2 challenge. Fish were challenged with 10^7 CFU x ml⁻¹ at 6, 9, 12 and 15 °C respectively. The results revealed a trend of increased mortality at increasing temperatures, and a significantly higher mortality was measured at 15 °C than at 6 °C. In the third experiment, fish was challenged with LP2, CECT 4600 and NRP 45. LP2 was re-isolated from dead fish, whereas the other two strains were not. *V. tapetis* was also isolated from fish that were challenged with CECT 4600 and NRP 45. The results show that *V. tapetis* may be pathogenic to corkwing wrasse, but mortality was however not higher in the LP2 challenged groups than in the other groups. Other fish that died during the experiment died due to infections with other *Vibrio* spp, and revealed the same pathology as LP2 infected fish. The results indicate that corkwing wrasse carry Vibrios, and that in particular *V. tapetis* and *V. splendidus* strains may cause disease when corkwing wrasse are kept in captivity. Experiments were carried out from June until September. Comparing the results from the different experiments, we found a high mortality of females caught during the spawning season, and the catch of corkwing wrasse should thus be avoided in this period. The results presented in this thesis may be used as a background for further studies of bacterial diseases of wild caught wrasse, improve wrasse welfare and move us a step further on the way to obtain a sustainable use of wrasse as cleaner fish in the growing salmonid aquaculture.

INNHOLD

INNLEDNING	1
Leppefiskfamilien (Labridae)	1
Grønnngylt (<i>Symphodus melops</i>)	3
Problemene med lakselus i oppdrett av laksefisk	5
Bekjempelse og kontroll av lakselus ved bruk av medikamenter	6
Bruken av leppefisk som rensefisk	6
Sykdommer hos leppefisk i fangenskap.....	10
Smitte mellom leppefisk og laks	12
<i>Vibrio</i> -gruppen.....	13
Vibrioseproblemer i marint oppdrett.....	14
Infeksjoner med <i>Vibrio tapetis</i> hos skjell	16
<i>V. tapetis</i> hos fisk.....	16
Klargjøring av rollen til <i>V. tapetis</i> i Norge	17
Målet med oppgaven.....	18
MATERIALE OG METODE.....	19
Forsøksfasiliteter og forsøksfisk	19
Bakterier benyttet ved smitte	20
Vekstmedier	20
Vekstkurver og oppdyrking av bakterier før smitte	21
Smitting av fisk ved bad og injeksjon	22
Prøvetaking av forsøksfisk.....	23
Smitteforsøk med grønnngylt	25
Forsøk 1. Bad- og ip - smitte med <i>V. tapetis</i> LP2.....	25
Forsøk 2. Smitte med <i>V. tapetis</i> LP2 ved økende temperatur	26
Forsøk 3. Smitte med LP2, CECT 4600 og NRP45 ved 12 °C og 15 °C.....	30
Identifisering av reisolerte bakterier fra forsøk 3.....	31
Molekylærbiologisk bestemmelse av de reisolerte bakteriene.....	33
Histologiske undersøkelser	38
Statistikk	38
RESULTATER	39
Forsøksfisk.....	39
Forsøk 1. Bad- og stikksmitte med <i>V. tapetis</i> LP2.....	39
Forsøk 2. Effekt av smitte med <i>V. tapetis</i> LP2 ved forskjellige temperaturer	42
Forsøk 3. Smitte med isolatene CECT 4600, LP2 og NRP45 ved 12 °C og 15 °C.....	45
Kliniske tegn / patologi.....	51
Lengde, vekt og kjønnsfordeling av forsøksfisk	53
DISKUSJON	54
Grønnngylt i fangenskap.....	54
Bruk av villfanget forsøksfisk.....	54
Avlving av forsøksfisk.....	55

Metoder benyttet til identifikasjon av bakterier fra død fisk	55
Sammenlikning av bad- og intraperitoneal smitte	56
Temperaturens innvirkning på dødeligheten av grønngylt	57
Dødelighet forbundet med kjønn og fangsttidspunkt	58
Kliniske tegn / patologi	59
Funn av bakterier fra smitteforsøkene	60
Konklusjoner	61
Anbefalinger og forslag til videre arbeid	62
REFERANSER	64
VEDLEGG	73
Vedlegg A. Medier og løsninger	73
Vedlegg B. Resultater fra sekvenseringer, og API 20E – profiler av bakterieisolater fra forsøk 3	75
Vedlegg C. Patologi hos døde fisk fra forsøkene	82
Vedlegg D. Rådata for grafer og tabeller	99

INNLEDNING

Leppefiskfamilien (Labridae)

Leppefiskfamilien, Labridae, er en stor og artsrik familie som er representert i alle verdenshav. De fleste av de rundt 500 artene hører hjemme i tropiske farvann, og holder gjerne til ved korallrev, på steinbunn eller bratte klipper med god vegetasjon (Darwall m. fl. 1992). Mange av leppefiskene har kraftige og varierte farger, og kjønnene har som oftest forskjellige farge - tegninger. Artene varierer mye i størrelse, med lengder fra 6 centimeter til 3 meter, og kan veie inntil flere hundre kilo. Kroppen er dekket av cycloide, vanligvis godt fastsittende skjell. Flertallet av artene har også velutviklede svelgben med kraftige tenner, og kjevene er mer eller mindre fremskytbare. Dette gjør dem velegnet til å nappe løs hele eller deler av fastsittende dyr. En del mindre arter av leppefisk lever helt eller delvis av å plukke ektoparasitter fra huden, gjellebuene og munnhulen hos andre, større fiskearter (Kvenseth og Solgaard 2003), og kalles derfor "rensefisker".

I våre farvann finnes det seks arter av leppefisk: gressgylt (*Centrolabrus exoletus*), grønngylt (*Symphodus melops*), bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*), berggylt (*Labrus bergylta*), rødnebb / blåstål (hunn / hann *Labrus mixtus*) og brungylt (*Acantholabrus palloni*). Disse artene blir betegnet som vanlige i Nord Europa, med unntak av brungylten, som sjelden fanges i større mengder (Costello 1991). I Norge er forekomsten av leppefisk størst på kysten av Sørlandet og Vestlandet. Nordgrensen går mellom Møre og Trøndelag (Hjartholm 1996), unntatt for bergnebb, som er funnet nord til og med Lofoten (Andersen m.fl. 1993). I Hordaland er leppefiskene alminnelige både i ytre kyststrøk (Høisæther m. fl. 1993) og i indre fjordområder (Alvsvåg 1993). Gressgylt, grønngylt, bergnebb, berggylt og rødnebb/blåstål lever hovedsakelig på grunnere dyp enn 30 meter, og kan gå helt opp i tidevannssonen ved høyvann. Brungylten observeres eller fanges vanligvis på større dyp enn de andre artene, men det finnes lite data om denne arten.

Leppefiskene er mest aktive i den varmeste perioden av året og frem til kuldeperioden starter i november (Hilldén 1984; Bjordal m.fl. 1991; Skog m.fl. 1994). Om vinteren forsvinner leppefiskene tilsynelatende fra de grunne områdene hvor de oppholder seg om sommeren. Dette har vært forklart med at de forflytter seg til dypereliggende områder (Hilldén 1984), og observasjoner gjort av Sayer m. fl. (1993) og Sayer m. fl. (1994) viser at leppefisken holder seg skjult i fjellsprekker og hulrom og går inn i en dvalelignende tilstand. Det er sannsynligvis sjøtemperaturen som styrer de sesongrelaterte variasjonene i forekomst (Green og Farwell

1971; Hilledén 1984). Endring i atferd for mange leppfiskarter er fra feltobservasjoner observert å inntre ved temperaturer under ca 8 °C (Sayer m. fl.1993).



Figur 1. Leppefiskene er knyttet til tang- og tarebeltet og ofte tallrike på grunt vann i sommerhalvåret. På bildet ser vi både rødnebb, grønngyllt, gressgyllt og bergnebb. Foto: Erling Svensen.

Voksne leppefisk beiter på et bredt spekter av fødeorganismer, hvor bunnlevende virvelløse dyr ofte utgjør hovedføden (Hilledén 1978). Imidlertid er leppefiskene opportunistiske i fødeveien, og spiser den føden som er mest tilgjengelig til enhver tid. Jo større fisken er, jo større fødeorganismer kan den spise. Leppefiskene spiser helst leddyr, som tanglopper, tanglus og hoppekreps, men tar også andre virvelløse dyr som snegler, flerbørstemark og skjell. Blåskjell er attraktiv føde og blir gjerne spist når de er ca 1- 2 mm (Hilledén 1978). Undersøkelser av mageprøver fra leppefisk viser at leppefiskens beiteaktivitet avtar med avtagende temperatur og stopper helt ved ca 4 - 5 °C (Hilledén 1978). Økt aktivitet ser ut til å inntre først ved temperaturer over 8 °C (Skog m. fl. 1994). Dette er sannsynligvis en av årsakene til at det med eksisterende fiskemetoder ikke er fangstgrunnlag for leppefisk i vinterhalvåret (Skog m. fl. 1994).

Grønngylt (*Symphodus melops*)

Grønngylten forekommer i øst Atlanteren fra Marokko til Midt-Norge, rundt Færøyene, i Middelhavet og vestlige deler av Østersjøen (Sayer og Treasurer 1996). Det mest karakteristiske kjennetegnet hos grønngylten er en mørk flekk ved haleroten, enten på eller litt nedenfor laterallinjen. Begge kjønn har en mørk halvmåneformet flekk bak øyet, men den er ikke alltid like fremtredende (Quignard og Pras 1986). Grønngylten har relativt høy kropp, med farger som kan variere med kjønn, sesong og graden av kjønnsmodning (Potts 1974). Fargen til grønngylt som ikke er kjønnsmoden varierer fra brunlig til brungrønn, og det er ikke forskjell mellom hunner og hanner. Hos kjønnsmoden fisk er det imidlertid forskjell i fargetegninger hos kjønnene. Mens hunnene har fargedrakt som likner fisk som ikke er kjønnsmodne, blir kjønnsmodne hanner ofte brungrønne med distinkte blå og røde striper på nedre del av hodet og på gjellelokkene. Modne hunner har en mørk blå urogenitalpapill (Quignard og Pras 1986; Costello 1991). Små grønngylter kan lett forveksles med små berggylter, og kan best skilles ved å se på preoperculum. Bakre kant av dette beinet har hos grønngylt en rekke fine tagger som mangler hos berggylt (Potts 1974).

Grønngylten er en vanlig leppefiskart på den norske vestkysten opp til Trondheimsfjorden, men har sammen med gressgylten en sørligere utbredelse enn de andre leppefiskene (Hilldén 1984). Det er stedvis store forekomster av grønngylt langs kysten (Kvenseth og Solgaard 2003). Grønngylten er oftest observert i tang- og tarebeltet i områder med steinbunn, helst på beskyttede lokaliteter grunnere enn fem meter (Hilldén 1984; Sayer og Treasurer 1996). I en undersøkelse foretatt av Hilldén (1984), ble grønngylten oftest observert fra overflaten og ned mot termo- og haloklin ved 12 meters dyp. Enkelte individer ble imidlertid sett på 20 – 25 meters dyp Hilldén (1984).

Hilldén (1984) registrerte stor variasjon fra år til år i forekomst av grønngylt på den svenske vestkysten, og fant indikasjoner på at grønngylten på grunn av sin mer sydlige utbredelse, muligens er mer sensitiv til kaldt vann enn de andre leppefiskartene. Studiene hans viste betydelig reduksjon i grønngyltbestanden etter kalde vintre. Dette er også vist gjennom strandnotttrekk utført av Havforskningsinstituttet i Flødevigen. Undersøkelsene som er utført siden 1925, tyder på at grønngyltbestandene svinger, og viser betydelig nedgang etter perioder med kalde vintre. Bestandene ser ut til å ta seg opp igjen etter perioder med varmere vintre.

Bestandsstrukturen til grønngylt ser ut til å bestå av små lokale bestander som domineres av rekruttering, dødelighet og vekst fremfor migrasjon. Dette bekreftes av nyere populasjons -

genetiske studier, som tyder på at bestandene er atskilte, med liten grad av horisontal vandring (Knutsen H, Havforskningsinstituttet, pers. medd.). Også merkeforsøk og gjenfangst tyder på at grønngyltene er stedbundne (Skiftesvik AB, Havforskningsinstituttet, pers. medd.).

Grønngylten er gonochoristisk, det vil si at de i motsetning til berggylt og blåstål/rødnebb – ikke skifter kjønn (Darwall m. fl. 1992). De gyter vanligvis i mai – juni. Grønngylthannen bygger da reir av algebiter i bergsprekker eller fordypninger i berget. Reirmaterialet blir samlet fra berget eller fra drivtang, og munnfuller av tang blir dyttet inn i reiret (Collins m. fl. 1996). I løpet av dagen er hannfisken i denne perioden i kontinuerlig aktivitet, der den veksler mellom reirbygging og patruljering av revir i en radius på om lag to meter rundt reiret. Hannen får i løpet av reirbyggingsperioden en aggressiv, territorial oppførsel, og nedre del av hodet og halsen får skinnende farger som intensiveres under gyteperioden. Den aggressive oppførselen er rettet både mot hanner og hunner, men oppførselen mot hunnene endres når reiret er ferdig og klart til å ta imot egg (Collins m. fl. 1996). I følge Dipper (1981) leder hannen hunnen til reiret ved en kurtiseringsdans stimulert av hunnfiskens farge, formen på buken, som er utspilt av egg, og den fremtredende blå urogenitalpapillen. Hannen vokter eggene frem til klekking, og jager andre hanner bort fra sitt territorium. Flere hunner kan legge egg i ett reir (Dipper 1981). Eggene ligger i reiret i 3 - 12 dager før de klekker, mens larvene den første tiden svever fritt i vannmassene (Stone 1996). Når eggene klekker, kan hannen gyte igjen med en ny hunn. Hildén (1984) antar imidlertid at hanner i nordlige strøk starter gytingen senere enn i sydlige områder på grunn av denne artens sensitivitet til lave temperaturer, og at den derfor kun gyter én gang. Under gytesesongen opptrer noen av hannfiskene som "transvestitthanner" eller "sekundær - hanner" (Alvsvåg 1993; Sayer og Treasurer 1996). Dette er funksjonelle hanner som uttrykker alle hunnlige sekundære kjønnskarakteristika, som mangler blåfargen til hannene, og har en blå papill, tilsvarende hunnens urogenitalpapill (Dipper 1981; Uglem m. fl. 2000). Disse fiskene har mye større testikler enn normalt, slik at buken buler og ligner buken til en gravid hunn. Sekundærhannene er så like hunnene at de ikke kan skilles fra hunner uten at gonadene undersøkes. Sekundærhannene lurer antakelig de normale hannene til å tro at de er hunner og kan derfor lett nærme seg hannens reir, svømme inn og spre sperm over ubefruktete egg. I de fleste fiskearter hvor sekundærhanner er beskrevet, er det unge, små hanner som er sekundærhanner, og som endrer strategi ettersom de vokser. Hos grønngylten ser det imidlertid ut som dette er en permanent situasjon, da det er forskjell i farge mellom normale hanner og sekundærhanner, og fordi disse observeres i de fleste aldersgrupper, både unge og gamle (Dipper 1981). Det antas derfor at noen grønngylt blir sekundærhanner på et tidlig stadium og fortsetter å være det hele livet (Dipper 1981). Hildén (1984) oppgir etter en undersøkelse på den svenske vestkysten, andelen av sekundærhanner til hele 20 % av hannene,

Sayer og Treasurer (1996) anslo en andel på 10 % på vestkysten av Skottland, mens Alvsvåg (1993) fant at andelen av sekundærhanner i Masfjorden varierte fra 0 – 8 %.

Problemene med lakselus i oppdrett av laksefisk

Parasittiske copepoder i familien Caligidae, ofte kalt fiskelus, forårsaker mange sykdomsutbrudd i marin akvakultur, spesielt i oppdrett av laks (Johnson m. fl. 2004).

De viktigste luseartene som angriper oppdrettslaks er lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og skottelus (*Caligus elongatus*). *Lepeophtheirus salmonis* finnes på kysten av Nord - Amerika, Canada, Irland, Skottland og Norge, mens *Caligus elongatus* er begrenset til Nord - Atlanteren, og er ikke funnet i Stillehavet (Mordue (Luntz) og Birkett 2009). *C. elongatus* har vært rapportert på 80 forskjellige fiskearter (Kabata 1979), mens *L. salmonis* er spesifikk for laksefisk, og blir ofte referert til som "vanlig lakselus".

Lakselusen lever utvendig på både vill og oppdrettet laksefisk i saltvann, og påfører fisken skader ved beiting på ytre slimlag, hud og blod (Pike og Wasorth 2000). Dette gjør fiskene mer sårbare for sekundære infeksjoner og kan gi alvorlige problemer med saltbalansen (Heuch m. fl. 2005). Videre representerer lusen med sin vandring fra vertedyr til vertedyr en potensiell smittespreder av laksesykdommer (Nylund m. fl. 1991; Petterson m. fl. 2009).

Luseinfeksjoner forårsaker enorme økonomiske tap i lakseoppdrettsnæringen på den nordlige halvkule (Mordue (Luntz) og Birkett 2009). *L. salmonis* er den dominerende lakselusarten i Nord - Atlanteren (Kvenseth m. fl. 2003), og infeksjoner med *L. salmonis* påfører næringen betydelige utgifter knyttet til behandling av atlantisk laks (Mordue (Luntz) og Birkett 2009). Da både ville- og oppdrettede laksefisk kan være vertedyr for lakselus, har interaksjoner og kryss-infeksjoner med parasitten mellom oppdrettsfisk og villfisk fått mye oppmerksomhet (Tully og Nolan 2002). Det store antallet av vertedyr som er tilgjengelige i laksemerder, kan resultere i produksjon av enorme mengder lakselus, og vurderes som en alvorlig trussel overfor ville bestander av laksefisk (Heuch m. fl. 2005). Oppdrettet atlantisk laks lever i tette populasjoner, og har ingen mulighet for flukt eller vandring til ferskvann. Oppdrettslaksen blir derfor et enkelt offer for lakselusa, året rundt. Det er derfor svært viktig at parasitten blir kontrollert, og det brukes derfor store summer på behandling. Estimerte kostnader til kontroll av fiskelus i sjø, ble på verdensbasis beregnet til en kostnad på i overkant av 300 millioner Euro i 2006. I Norge ble kostnadene samme år beregnet til omtrent 131 millioner Euro (Costello 2009).

Bekjempelse og kontroll av lakselus ved bruk av medikamenter

Det benyttes to typer behandling mot lakselus. Det er syntetiske pyretroider som brukes til badbehandlinger, og medisiner som blir gitt via fôret (Nilsen m. fl. 2008). Den teknologiske utviklingen med svært store merder har ført til at badbehandlingen har blitt vanskeligere å utføre og er mindre effektiv. Stress i forindelse med badbehandling kan også resultere i høy dødelighet. Dette har gitt en sterk økning i bruk av oral behandling. Middelet Emamectine Benzoate (SLICE®) kom på markedet i 1998, og inntok raskt en dominerende posisjon i oral lusebehandling (Kvenseth m. fl. 2003). Det er imidlertid ikke optimalt å basere kontroll av parasitten på kjemiske behandlingsmetoder. De største ulempene med lusemidlene er de miljøtoksiske konsekvensene og faren for utvikling av resistente lusepopulasjoner (Treasurer m. fl. 2000; Nilsen m. fl. 2008). Fra lakseoppdrettsanlegg er det registrert resistente lus både mot bademidler og medisinfôr flere steder langs kysten, og i 2007 og 2008 ble det meldt om behandlingssvikt mot SLICE® (Nilsen m. fl. 2008). I 2009 og 2010 var lusemidlene Azametifos, Diflubenzuron og Teflubenzuron mest benyttet, men det er registrert behandlingssvikt også mot disse preparatene (Nilsen 2011). I tillegg har problemene med laksesykdommer som pancreas-syke (PD), hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB), cardiomyopatisyndrom (CMS) økt, og vanskeliggjort bruken av fôrbehandling ytterligere. Dette henger sammen med at syk laks har nedsatt appetitt, og dermed har dårlig respons på behandling gjennom fôr. Som en konsekvens av dette, er det et kontinuerlig behov for alternative strategier til kontroll av lakselus.

Bruken av leppefisk som rensefisk

Bruk av leppefisk som rensefisk for å kontrollere infeksjoner med lakselus er en alternativ behandlingsmetode, og kan være et forebyggende tiltak for å redusere bruken av medikamentell avlusning. Dette vil også redusere faren for utvikling av resistens mot de mest brukte avlusningsmidler og redusere det negative fokuset som er blitt rettet mot oppdrettsnæringen. Dette er viktig for å ivareta en bærekraftig utvikling (Kvenseth m. fl. 2003).

De første vitenskapelige forsøkene med leppefisk til biologisk avlusning av oppdrettslaks ble utført i Norge av Bjordal (1988). De første forsøkene ble utført i akvarier med lokalfanget leppefisk. Laboratorieforsøkene ble fulgt opp med eksperimenter i forsøksmerder og siden i kommersielle merder (Bjordal 1988, 1990 og 1992). I alle forsøkene ble det funnet signifikant reduksjon av lus på laksen, og det ble konkludert med at leppefisk fra våre farvann var godt egnet til å fjerne lakselus. Rensefiskteknologien går ut på at villfanget leppefisk blir plassert i laksemerder i et forhold på ca 1:50 – 150 (leppefisk : laks). Lusemengden begrenses ved at

leppefisken svømmer blant laksen og spiser lus fra huden til laksen (Costello 1996 b). Fra 1988 ble leppefisk tatt i bruk som renseskisk i Norge, og fra 1990 ble renseskismetoden en viktig del av lusekontrollen (Bjordal 1990, 1992). Siden 1989 er metoden også blitt mye benyttet på laksefarmer i Skottland, Irland (Costello og Bjordal 1990), Shetland og Færøyene (Kvenseth 1993a og b).

Det er en rekke fordeler med å bruke leppefisk. Leppefiskbasert lusekontroll ser ikke ut til å stresse laksen (Costello 1996 a). Leppefisken beiter også på begroingsorganismer, noe som bidrar til å rense nøtene (Kvenseth 1996). Når leppefisken beiter på lakselus, skjer det en kontinuerlig avlusning, som forsterkes av at leppefiskene særlig spiser voksne hunnlus (Kvenseth og Solgaard 2003).

Berggyllt, bergnebb, gressgyllt og grønngyllt er de leppefiskartene som er mest benyttet som renseskisk i oppdrettssammenheng. Alle disse leppefiskartene beiter lakselus, men leppefisk som renseskisk har gitt størst suksess hos smålaks under to kilo som er første året i sjøen. Innfanget leppefisk settes ut sammen med smolten og vokser sammen med den i merdene utover sommeren og høsten. Det er viktig at størrelsesforholdet mellom laks og leppefisk er riktig. Er leppefiskene for store i forhold til laksen, er det mistanke om at leppefisken kan skade laksen ved å nappe øyne. Er leppefiskene for små, kan de bli påført skader eller bli spist av laksen. Videre er det viktig å passe på at leppefiskene har rett størrelse i forhold til merdmaskene, slik at de ikke rømmer. De ulike leppefiskartene har noe ulike egenskaper og bruksområder:

Bergnebb blir i all hovedsak brukt til laks som er første året i sjø, fordi den blir for liten sammen med stor laks. Denne arten har tallrike forekomster langs store deler av norskekysten, og har vært flittigst benyttet til lusekontroll hos smålaks. Den regnes som effektiv og hardfør, og beiter ved temperaturer ned til 6 -7 °C (Kvenseth og Solgaard 2003).

Gressgyllt har i praktisk oppdrett vist seg å være mer ”sensitiv”, da det registreres høyere dødelighet for denne arten enn de andre leppefiskartene (Kvenseth PG, pers. medd.). I de fleste fangstområdene er den heller ikke så tallrik som de andre artene.

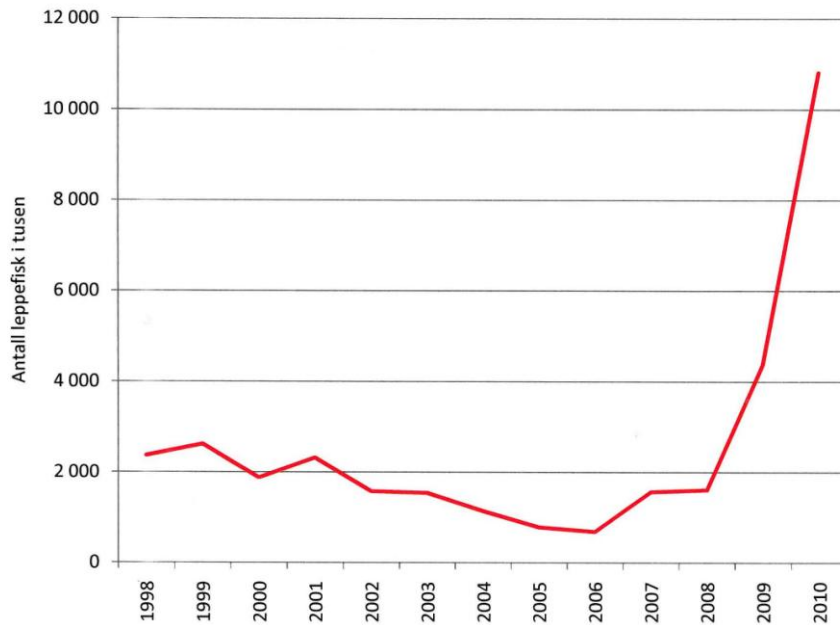
Berggyllt er den største av leppefiskene i våre farvann. Den kan som hann bli aggressiv i gytetiden, og det er derfor viktig å sortere vekk de største fiskene. Berggyllt kan brukes som luseplukker på alle størrelser av laks. Det er imidlertid for liten vill bestand til at berggyllt kan benyttes i stor skala (Skiftesvik m. fl. 2007). Villfanget berggyllt blir ofte for stor sammen med smålaks, men til store laks over to kilo har berggyllten vist seg å være svært effektiv. Den er dessuten aktiv helt ned til 3,5 °C og

kan derved benyttes på mange lokaliteter gjennom hele vinteren ([Kvenseth og Solgaard 2003](#)). Det er utført vellykkede forsøk med oppdrett på berggylt, og kommersielle selskaper satser nå stort på produksjon av denne arten til bruk i laksemerder. Det vil derfor etter hvert bli tilgjengelig små berggylt som kan benyttes til små laks.

Grønngylten kan benyttes til alle størrelser av laks, hvis den sorteres etter størrelse. Til små laks benyttes grønngylt gjerne i kombinasjon med bergnebb. En rekke oppdrettere har også hatt gode resultater med bruken av grønngylt til stor laks, og rapporterer at den er aktiv ved temperaturer ned mot 5 °C ([Kvenseth og Solgaard 2003](#)).

Erfaringer med leppefisk hos aktører langs norskekysten er imidlertid ulike, og det er utført få vitenskapelige undersøkelser av artenes egnethet som lusespisere. I en studie som ble gjort for å sammenlikne egnetheten til ulike arter leppefisk (grønngylt, gressgylt, bergnebb og berggylt) i merd, var det flest individer av berggylt og grønngylt som spiste lus og hadde høyest antall individer med lus i magen ([Rodewald og Øien 2006](#)). Grønngylt kom best ut fra forsøket, da den så ut til å trives best i merdene, og viste seg å være en effektiv beiter på både lus og begroingsorganismer. Bergnebben, som tradisjonelt har hatt stor utbredelse i oppdrettssammenheng, kom dårligst ut i forsøket, og viste seg å være en ”middelmådig” luse- og begroingsbeiter. På grunnlag av disse resultatene kan det være aktuelt å rette sterkere fokus på grønngylt som lusebeiter ([Solgaard m. fl. 2006](#)).

Bruken av leppefisk som renseskisk i norske merder har variert en hel del. Det var relativt høy bruk i 1999, med vel 2,5 millioner fisk ([statistikk Fiskeridirektoratet 2009](#)). Etter 2001 fikk bruken en rask tilbakegang frem til 2006, hvor antallet var nede i omtrent 700 000. I 2007 kom imidlertid de første rapportene om lakselus som hadde nedsatt følsomhet mot medikamenter som ble benyttet til lusebehandling av fisk. I løpet av 2008 økte disse tilfellene ytterligere ([Nilsen 2008](#)). Bruken av leppefisken fikk på grunn av dette et nytt oppsving, og i perioden fra 2006 til 2007 steg bruken av leppefisk fra henholdsvis 682 000 til 1 564 000, mens forbruket i 2009 var på 4 372 000 ([statistikk Fiskeridirektoratet 2010](#)). I 2010 var forbruket anslått til å være over 10 millioner leppefisk (se figur 2).



Figur 2. Antall leppefisk (tusener) rapportert brukt av oppdrettsnæringen. (Kilde: fiskeridirektoratet).

Det er flere årsaker til den ovenfor nevnte nedgangen i leppefiskbruken på begynnelsen av 2000-tallet. En viktig årsak er at leppefisken tapte terreng på grunn av introduksjonen av SLICE®. Mange oppdrettere opplever også store tap av leppefisk i merdene, særlig av grønnngylt. Tapene er spesielt store om vinteren (Kvenseth 1996), og er fra flere oppdrettere rapportert å være opptil 90 % (Kvenseth PG, pers. medd.). Oppdrettere registrerer imidlertid også store tap av leppefisk om sommeren. Tapene er ikke fullt ut årsaksforklart. Rømminger og fisk som setter seg fast i merdmaskene kan forklare noe av tapene. Enkelte oppdrettere holder det som sannsynlig at laksen spiser en del av leppefisken (Kvenseth PG, pers. medd.). Vi vet også at flere leppefiskarter er svært utsatte for bakteriesykdommer. Treasurer og Cox (1991) foreslo at fiskens levesett kan være en forklaring; leppefiskene tilbringer vinteren i mørket under steiner og i bergsprekker. I oppdrett vil denne atferden føre til at fisken søker mot den dypeste og mørkeste delen av merden hvor det ligger dødfisk og smittepresset er størst.

På tross av en del problemer viser praktiske erfaringer at tapsproblemene i stor grad kan overkommes og at bruken av leppefisk kan etableres på en hensiktsmessig måte. Dersom det blir sørget for at nøtene er rene før utsett av leppefisk, og det legges inn skjulesteder til leppefiskene på ulike dyp i merdene (viktig for å sikre overlevelse vinterstid), har mange oppdrettere hatt svært vellykkede erfaring med leppefisk (Bergthun 2008 og Kvenseth PG, pers. medd.).

Sykdommer hos leppefisk i fangenskap

Sykdom kan føre til tap av leppefisk, og dermed redusere effektiviteten av avlusingen. I tillegg kommer de praktiske og etiske aspektene omkring behovet for forebygging og behandling av sykdom, hos en art som er satt inn i en produksjonssituasjon. Det er imidlertid lite informasjon om sykdommer på leppefisk. Inntil leppefisk ble tatt i bruk som rensfisk for kontroll av lakselus i oppdrettsmerder, hadde leppefisk ikke kommersiell verdi i Nord - Europa. Fra tiden før Bjordal sine forsøk på 1990 - tallet, finnes det derfor lite publisert informasjon om sykdommer hos leppefisk ([Treasurer 1996](#)).

Leppefisk som benyttes som rensfisk i dag, er i all hovedsak innfanget villfisk, og stress og skade som følge av fiske, håndtering og transport av leppefisk, kan føre til utbrudd av sykdommer og medføre død hos leppefisk som bærer en latent infeksjon ([Laidler 1999](#)). Det er til nå ikke påvist virusinfeksjoner hos villfanget leppefisk, verken før eller etter at den har vært i kontakt med laks. I en nyere undersøkelse fra oppdrettsanlegg i Rogaland ble leppefisk undersøkt for syv virustyper (atlantisk laks paramyxovirus (ASPV), infeksiøs lakseanemivirus (ILAV), norsk salmonid alfavirus (NSAV)(PD), infeksiøs hemapoiotisk nekrosevirus (IHNV), reovirus (assosiert med hjerte- og skjelettmuskebetennelse, HSMB), nodavirus (VNNV) og viral hemoragisk septikemivirus (VHSV). Leppefisken hadde gått sammen med laks på ulike alderstrinn. Undersøkelsen konkluderte med at ingen av virustypene ble påvist ([Lundblad m. fl. 2010](#)).

Flere parasitter har blitt funnet hos leppefisk. Noen av disse, for eksempel *Trichodina* spp., kan være involvert i vinter -dødelighet hos leppefisk. Mikrosporidieparasitten *Ichthyosporidium gigantum* kan forårsake store byller og svulster på grønnngylt, og da mikrosporidier ofte smitter direkte mellom fisk, representerer parasitten et potensielt problem i et eventuelt grønnngylt - oppdrett ([Espeland m. fl. 2010](#)). Det er blitt registrert 54 arter parasitter hos berggylt, og av disse er 33 arter funnet på berggylt i Norge ([Karlsbakk m. fl. 2011](#)).

Ut fra de erfaringene som er gjort så langt, ser det ut til at det først og fremst er bakterie - infeksjoner som forårsaker problemer hos leppefisk i fangenskap ([Kvenseth og Solgaard 2003](#)). Atypisk furunkulose, forårsaket av bakterien *Aeromonas salmonicida* subspecies *achromogenes* (atypisk *A. salmonicida*) er ved flere anledninger isolert fra leppefisk benyttet som rensfisk. Denne bakterien har vært påvist i naturlige populasjoner ([Frerichs m. fl. 1992](#); [Costello 1996 b](#)), og vist seg å forårsake høy dødelighet hos bergnebb i laksemerder ([Kvenseth 1996](#); [Laidler m. fl. 1999](#)) og i laboratoriestudier ([Gravningen m. fl. 1996](#); [Samuelsen m. fl. 2002 og 2003](#)). Det antas

at leppefisk kan være bærere av atypisk *A. salmonicida*, og at kliniske utbrudd av bakterien induseres av stress. Det regnes imidlertid som lite sannsynlig at leppefisk vil dø av atypisk *A. salmonicida* under optimale forhold (Laidler m. fl. 1999). En annen bakterie som har vært påvist hos leppefisk, er *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* (*A. salmonicida*) (Treasurer og Laidler 1994), som er sykdomsfremkallende agens for "typisk" furunkulose hos laksefisk, og har tidligere vært en av hovedårsakene til økonomiske tap i lakseoppdrettsindustrien (Bricknell m. fl. 1996). Leppefisk har vist seg å være mottakelig for *A. salmonicida* ved kohabitering med syk laks i merd (Collins m. fl. 1991; Treasurer og Cox 1991; Treasurer og Laidler 1994; Hjeltnes m. fl. 1995; Bricknell m. fl. 1996). Bakterien er isolert fra døde leppefisk, men mange leppefisk ser imidlertid ut til å kunne restitueres fra sykdommen, og gå over til en kronisk bærertilstand, og dermed utgjøre et mulig smittereservoar for laksen (Bricknell m. fl. 1996). De overfornevnte studiene er hovedsakelig utført med bergnebb, med unntak av forsøket til Bricknell m. fl. (1996), som i tillegg til bergnebb også benyttet berggyllt.

Infeksjoner med *Vibrio* spp. er også vist å være et problem hos leppefisk, men det finnes relativt få vitenskapelige arbeider som belyser problemene. I et smitteforsøk med en stamme av *Vibrio anguillarum* på bergnebb ble det dokumentert at *V. anguillarum* kan være svært patogen for denne arten (Gravningen m. fl. 1996). I en undersøkelse av villfanget bergnebb og grønnngylt ble *Vibrio* sp. påvist i renkultur fra flere individer (Costello 1996 b). Studien gir imidlertid lite informasjon, da funnene ikke ble relatert til vertsart, og bakterien ikke ble bestemt nærmere. Grønnngylt ser ut til å skille seg ut fra bergnebb og berggyllt ved at den får "klassiske" vibriose-symptomer tilsvarende de symptomer som er vanlige ved infeksjoner med *Vibrio anguillarum* (se side 14). Flere oppdrettere opplever problemer med vibriose på denne arten (Kvenseth og Solgaard 2003), og erfaringene fra vitenskapelige forsøk bekrefter disse problemene. Grønnngylt blir svært stresset når man tar den inn i kar, selv om det brukes forskjellig slags skjul for å imitere fiskens naturlige miljø og redusere stresset. Laboratorieforsøk har vist problemer med dødelighet hos grønnngylt kort tid etter ankomst i forsøkskar. Årsaken har vanligvis vært vibriose (Kirkemo m. fl. 2003). I forsøk utført av Jensen m. fl. (2003) og Samuelsen m. fl. (2003), ble grønnngylten funnet å være mottakelig for infeksjoner av opportunistiske bakterier, særlig *Vibrio* spp., når den ble holdt under antatt suboptimale forhold i fangenskap. Deres observasjoner bekrefter at grønnngylten blir svært stresset når den settes i kar. Ytre tegn som ble observert på fisken er sårdannelser på buken og sidene, passiv atferd og dårlig appetitt. Dette er også rapportert av Kirkemo m. fl. (2003) og Bergh og Samuelsen (2007).

Det finnes lite dokumentasjon på hvilke bakterier som forårsaker sykdom hos grønnngylt. *Vibrio splendidus* og *Vibrio tapetis* er imidlertid isolert fra grønnngylt ved flere anledninger, både fra

laksemerder (Einen ACB, pers. medd.) og fra grønngylt holdt i laboratorieforsøk (Samuelsen m. fl. 2000; Jensen m. fl. 2003). *V. splendidus* er en velkjent marin bakterie som er isolert fra en rekke arter i oppdrett. *Vibrio tapetis* er best beskrevet fra Asiatisk teppeskjell, *Ruditapes philippinarum* (se side 16 – 17). I 1998 isolerte Samuelsen m. fl. (2000) *V. splendidus* fra en gruppe grønngylt med høy dødelighet i laboratoriekar. Fiskene var villfangete, tilsynelatende ved god helse og skulle benyttes til eksperimentelle studier. Fra alle døde fisk ble det påvist *Vibrio* sp. ved dyrking fra nyre. Ett isolat (LP1), ble siden karakterisert som *V. splendidus* (Jensen m. fl. 2003). I 1999 ble nye villfangete grønngylt hentet inn og plassert i kar. Igjen ble det registrert dødelighet, og en dominerende *Vibrio* sp., kalt LP2, ble karakterisert til å være en *V. tapetis*- stamme (Jensen m. fl. 2003). Også fisk i denne forsøksserien hadde dårlig appetitt og var passive, og noen av fiskene hadde hudsår. Indre symptomer ble ikke beskrevet i disse forsøkene. Bergh og Samuelsen (2007) utførte smitteforsøk med *V. tapetis* (LP2) på grønngylt, og med *V. splendidus* (LP1) på grønngylt og bergnebb. Resultatene viste høy dødelighet hos grønngylten som ble smittet med LP2, og smitte med LP1 resulterte i betydelig høyere dødelighet hos grønngylt enn hos bergnebb.

Smitte mellom leppefisk og laks

Siden leppefisk settes i samme miljø som laks i merder med stor fisketetthet, er det viktig å avklare om sykdommer kan overføres fra leppefisk til oppdrettslaks. Det er funnet en del sykdomsfremkallende parasitter på leppefisk, men dette er ikke parasitter som er kjente patogener på laks (Costello 1996b; Karlsbakk m. fl. 1996). Når det gjelder bakteriesykdommer, tyder forsøk på at det er lite sannsynlig at atypisk furunkulose kan overføres fra leppefisk til laks som er vaksinert (Laidler m. fl. 1999). På bakgrunn av funnene av typisk *A. salmonicida* hos bergnebb har det hersket en del usikkerhet rundt spørsmålet om bergnebb kan fungere som reservoar for denne bakterien når den holdes sammen med Atlantisk laks (Treasurer og Cox 1991; Treasurer m. fl. 1994, Bricknell m. fl. 1996 og Kirkemo m. fl. 2003). Bricknell m. fl. (1996) fant at bergnebb, etter smitte med typisk *A. salmonicida* kunne restitueres, men kan utvikle en kronisk infeksjon. De mente at det er sannsynlig at leppefisk ikke primært blir infisert av typisk *A. salmonicida*, men kan smittes av infisert laks og fungere som en vektor ved overføring av furunkulose. Treasurer og Cox (1991) konkluderte med at leppefisk ikke må slippes ut i frihet eller transporteres mellom merder etter å ha vært i produksjonssyklus med laks.

Ved smitteforsøk på uvaksinert laks med grønngyltisolatene *V. tapetis* (LP2) og *V. splendidus* (LP1) ble det ikke påvist vibriose hos laksen, og de injiserte bakteriene ble ikke reisolert (Bergh

og Samuelsen 2007). I en annen studie ble *Vibrio* - isolater fra leppefisk undersøkt med hensyn på om de var kjente laksepatogene bakterier. Undersøkelsen viste at dette ikke var tilfelle, og resultatene fra de nevnte studiene kan tyde på at *Vibrio* - bakterier som gir sykdom hos leppefisk ikke gir problemer med sykdom hos laks. Imidlertid ble *Vibrio* - isolatene funnet hos leppefisk av Costello (1996 b) ikke nærmere karakterisert. Dette er også tilfelle ved de fleste sykdomstilfellene i norske anlegg. Oppdrettsanleggenes helsetilsyn har undersøkt *Vibrio* - isolater fra syk leppefisk hovedsakelig med hensyn på om de er kjente laksepatogene *Vibrio* - bakterier. Siden en videre karakterisering av isolatene ikke har blitt utført, finnes det i dag minimalt med tilgjengelige data om hvilke *Vibrio* - isolater som gir sykdom hos leppefisk i Norge. Da *Vibrio* -bakterier kan opptre i både harmløse og patogene varianter, og vi videre kjenner til at virulensfaktorer kan tilegnes bakterier ved horisontal genoverføring gjennom mikrobielle kontakter i miljøet (Thompson m. fl. 2004), er det derfor svært viktig med mer presis informasjon om funn av *Vibrio* - bakterier i oppdrettsmiljøet.

Når det gjelder virussykdommer, er det lite kunnskap om dette hos leppefisk. Forsøk med å smitte bergnebb med ILA fra laks har ikke gitt indikasjoner på at leppefisk kan være bærer av ILA-virus (Kirkemo m. fl. 2003). Screeningundersøkelser av berggyllt fra laksemerder med utbrudd av ILA indikerer også at leppefisken ikke er mottakelig for ILA-smitte. Tilsvarende ble det heller ikke påvist PD-virus hos leppefisk som hadde gått i merder med utbrudd av PD (Aspehaug V, PatoGen Analyse, pers. medd.). Eksperimentelle smitteforsøk med IPNV fra laks har imidlertid vist at bergnebb kan være mottakelig for IPN (Gibson m. fl. 1998).

De fleste parasittarter som er funnet hos leppefisk er artsspesifikke, og vil derfor trolig ikke utgjøre en trussel mot laks (Costello 1996 b, Treasurer 1997). Av de parasittartene som er funnet hos berggyllt i Norge, har imidlertid 9 arter direkte livssyklus. Disse 9 artene har dermed smittespredning gjennom vannet, og kan spres mellom leppefisk i merd og teoretisk også til laks (Karlsbakk m. fl. 2011).

***Vibrio*-gruppen**

Vibrio - artene tilhører familien Vibrionaceae, som er en av de mest diverse og velstuderte bakteriegrupper (Thompson m. fl. 2004). Familien Vibrionaceae består av åtte slekter, der *Vibrio* er den største, med 65 arter. Det er imidlertid en konstant endring i taksonomien til Vibrionaceae, da det stadig beskrives nye slekter og arter (Thompson og Swings 2006).

Vibrio-bakteriene er Gram-negative, rette eller lett kurvede staver med varierende størrelse 0,3-1,3 µm tykke og 1,4-5 µm lange (Bergey og Holt 2009). Deres karakteristiske vibrio- eller kommaformede fasong, kan være mer eller mindre tydelig, avhengig av art og vekstmedium. Bakteriene er ikke sporedannende, og er bevegelige med flageller. Deres mest karakteristiske egenskap i laboratoriekultur, er deres følsomhet for 150 µg vibriostat 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) per ml medium, som hemmer deling av bakteriene (Colwell og Grimes 1984). Karbohydrater fermenteres med produksjon av syre, men ikke gass. Noen arter produserer en stor variasjon av enzymer (Austin og Austin 2007).

Bakterier i *Vibrio*- gruppen er globalt viktige på grunn av deres hyppige forekomst i et bredt spekter av økologiske nisjer (Ruby og Lee 1998). Flere *Vibrio* - arter er allestedsnærværende i akvatiske økosystemer, inkludert brakkvannsområder, åpne kystfarvann, i sedimenter og i akvakulturområder i hele verden, og flere studier har vist at *Vibrio* - bakterier finnes i særlig høye tettheter i eller på marine organismer som koraller, fisk, skjell, marine planter, alger, svamper, reker og zooplankton (Thompson m. fl. 2004). Bakteriene har en ekstraordinær høy vekstrate, som gjør dem suksessfulle og dominerende, spesielt i eutrofe miljøer (Thompson m. fl. 2004). Mange av dem har vist deg å kunne overleve i sjøvann i lang tid, f. eks *Vibrio splendidus*, som er vist å kunne overleve inntil 130 dager i sjøvann (Armada m. fl. 2003).

Vibrioseproblemer i marint oppdrett

Vibriose var tidligere synonymt med en blodforgiftning (septikemi) som skyldes bakterien *Vibrio anguillarum* (Cowell og Grimes 1984; Egidius 1987). Etter som flere *Vibrio* spp. har blitt funnet å forårsake sykdom, er vibriose i dag en gruppe sykdommer som skilles med særnavn (klassisk vibriose, kaldtvannsvibriose) eller ved spesifisering av agens.

Kliniske tegn ved vibriose er lik dem man finner ved mange andre sykdommer som gir septikemi, og starter vanligvis med generelle symptomer som appetittsvikt, apati og misfarging (mørkpigmentering / blekhet). Rødfarging (erythemer) ved finnebasis, munnregionen og ved gattet og små hudblødninger (petecchier) er vanlig. Hudforandringene utvikler seg ofte til dype sår av varierende størrelse, og finneråte kan være mer eller mindre uttalt. Ved obduksjon kan det septikemiske bildet være mer eller mindre uttalt, og omfatte patologiske forandringer som punktblødninger (petecchier) i fettvev og indre organer (vicera). Milten er ofte svullen og tarmkanalen kan være dilatert og væskefylt. Buken kan være utspilt på grunn av omfattende ødemer og væske i bukhulen (ascites)(Larsen og Pedersen 1999). Patologien henger sammen med bakteriens evne til å bryte ned vertens vev for å frigjøre energi og næring, der *V. anguillarum* skiller ut en rekke protolytiske toksiner som er med å gi det septikemiske bildet.

Sykdommen gir vanligvis høy dødelighet ved akutt og subakutt forløp (Egidius 1987). I fiskeoppdrett kan vibriose behandles med antibakterielle midler, og det er utviklet effektive vaksiner for de viktigste artene i norsk oppdrett (laks, ørret, torsk).

Vibrioser forårsaker imidlertid store problemer i marint oppdrett over hele verden, og en rekke arter kan forårsake sykdom hos et bredt spekter av akvatiske organismer (Vandenbergh 2002), som for eksempel penaeide reker (Lightner 1993; Thompson m. fl. 2004), skjell, snegl og en rekke fiskearter (Austin og Austin 1999).

Vibrio anguillarum (synonym med *Listonella anguillarum*), *Vibrio salmonicida* (synonym med *Aliivibrio salmonicida*) og *V. vulnificus* er blant de viktigste bakteriepatogenene hos mange fiskearter. Alle er forbundet med akutt bakteriell septikemi eller kronisk fokale lesjoner i marin fisk (Thompson m. fl. 2004). *Vibrio anguillarum* er vidt utbredt hos en rekke økonomisk viktige varmt- og kaldtsvannsfiskearter, som stillehavslaks (*Oncorhynchus* spp.), atlantisk laks, regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), piggyvar (*Psetta maxima*), havabbor (*Dicentrarchus labrax*), havkaruss (*Sparus aurata*), striped bass (*Morone saxatilis*) og torsk (*Gadus morhua*) (Toranzo m. fl. 2004).

Generelt er vibriose observert i forbindelse med stress eller fysisk trauma, og mange *Vibrio*-arter er opportunistiske bakterier i fisk. Videre kan enkelte stammer innenfor en art være svært patogene, mens andre kan være harmløse eller kun opptre som sekundære patogener (Austin og Austin 1999).

De patogene effektene av enkelte *Vibrio*-stammer er kritiske under oppdrettsforhold, hvor organismer holdes i høye tettheter og ofte kunstige forhold. Det ser ut til at slike forhold favoriserer oppformering av *Vibrio*-bakterier og øker virulens og sykdomsprevalens (Thompson m. fl. 2004). I larvestadier hos oppdrettede fisk og skjell kan bakteriene opptre akutt og forårsake opp mot 100 % dødelighet (Thompson m. fl. 2004). Et eksempel på en slik opportunistisk bakterieart er *Vibrio splendidus*. Det finnes svært mange stammer av bakterien, som er vidt distribuert i akvatiske økosystemer, og er vanlig i mange forskjellige marine habitater (Thompson m. fl. 2004, Le Roux og Austin 2006). *Vibrio splendidus* - stammer er vist å være patogene for flere skjellarter, og kan forårsake septikemi og vibriose hos fisk (Austin og Austin 2007, Le Roux og Austin 2006). *Vibrio splendidus* - isolatet LP1, er videre antatt å kunne forårsake sykdom hos grønngylt (Jensen m. fl. 2003). På grunn av lang overlevelsestid i sjøvann (Armada m. fl. 2003), er disse bakteriene vanskelige å bekjempe.

Infeksjoner med *Vibrio tapetis* hos skjell

Inntil bakterien ble påvist hos grønngylt av [Jensen m. fl. \(2003\)](#), var *V. tapetis* tidligere kun påvist hos skjell. Bakterien ble først rapportert i Frankrike hos det innførte Asiatiske teppeskjellet *Ruditapes philippinarum*, hvor den forårsaker sykdommen Brown Ring Disease (BRD) ([Paillard m. fl. 1994](#)). Skjellene som blir angrepet av *Vibrio tapetis* får en unormal brun avleiring av organisk materiale, conchiolin, på innsiden av skallet. Denne avleiringen er vanligvis lokalisert mellom palliallinjen og skalkanten, og danner en karakteristisk ring, derav navnet "Brown Ring Disease". Sykdommen er senere påvist hos ville og dyrkede sandskjellarter i Frankrike, Spania, England, Irland og Italia ([Paillard 2004](#)), men har aldri vært rapportert fra Japan, hvor det asiatiske teppeskjellet har sin opprinnelse ([Paillard m. fl. 1994](#)). Det første alvorlige sykdomsutbruddet utviklet seg i et klekkeri i Frankrike i 1986. Sommeren 1987 ble det observert massedødelighet av yngel og voksne teppeskjell på dyrkningsfeltene på vestkysten av Frankrike. Siden 1989 har sykdommen gradvis blitt påvist langs hele den østlige atlanterhavskysten, fra Nord - Afrika til England ([Paillard 2004](#)). BRD ble først observert i Spania i 1994, i England i 1997 og i Irland i 1998 ([Paillard m. fl. 1994](#); [Castro m. fl. 1996](#) og [Novoa m. fl. 1998](#)). Den høyeste prevalensen av sykdommen er registrert i de nordligste områdene, og BRD er vanligvis regnet som en kaldtvannssykdom ([Paillard m. fl. 2004](#)). I eksperimentelle studier er det vist at *V. tapetis* er patogen også for sandskjellartene *Ruditapes decussatus*, *Tapes rhomboides* og *Venerupis aurea* ([Maes og Paillard 1992](#)). Syke skjell kommer opp til overflaten av bunnsedimentet, og blir dermed lett tilgjengelig føde for fisk og andre predatorer ([Paillard C, pers. medd.](#)).

***V. tapetis* hos fisk**

Funnet av *V. tapetis* hos grønngylt i Norge representerte det første funnet av denne bakterien hos virveldyr, og var det første funnet av denne bakterien i Norge ([Jensen m. fl. 2003](#)). I Skottland har forskere isolert en *V. tapetis* - stamme hos døende kveite, *Hippoglossus hippoglossus* ([Reid m. fl. 2003](#)). Bakterien ble isolert fra kveiteyngel i kar med fisk som led av kronisk dødelighet. Forbindelsen mellom *V. tapetis* og kveite er uklar, da isolatet ikke induserte sykdom hos kveite under laboratorieforsøk. Konklusjonen fra disse studiene var at *V. tapetis* ikke er en trussel for kveite under optimale oppdrettsbetingelser, men kan opptre som en opportunist under suboptimale forhold ([Reid m. fl. 2003](#)). *V. tapetis* er også funnet i oppdrettet Wedge sole, *Dicologlossa cuneata* Moreau, i Spania ([López m. fl. 2011](#)). Bakterien induserte ikke sykdom ved smitte i eksperimentelle forsøk med denne fiskearten.

Klargjøring av rollen til *V. tapetis* i Norge

Som nevnt på side 20 ble *V. tapetis* først beskrevet fra det asiatiske teppeskjellet *Ruditapes philippinarum*. Denne skjellarten ble introdusert til Norge i 1987 (Mortensen og Strand 2000). Mellom 1988 og 1991 ble teppeskjellyngel satt ut på strender på seks lokaliteter; Espevik og Seløy på Tysnes, tre lokaliteter i Sør Trøndelag og en i Nordland fylke. Overlevende, voksne asiatiske teppeskjell ble funnet igjen på tre av disse lokalitetene i 1995 og 1996, og det viste seg at Seløy var den lokaliteten hvor flest asiatisk teppeskjell hadde overlevd. Det ble ikke funnet yngel ved undersøkelsene, og det var derfor ingen indikasjon på at arten hadde etablert seg i norsk fauna (Mortensen og Strand 2000).

Grønngylten i forsøkene til Jensen m. fl. (2003), fikk påvist *V. tapetis* fra nyreutstryk. Fiskene ble fanget i det samme fjordsystemet som de overlevende teppeskjellene i Seløypollen, og det ble stilt spørsmål om *V. tapetis* kunne være overført fra disse teppeskjellene til grønngylt. Det ble derfor utført nye undersøkelser med innhøsting av teppeskjell fra Seløypollen. I 2003 og 2004 fant Paillard m. fl. (2008) henholdsvis 7 og 17 skjell, som ble undersøkt med hensyn på kliniske tegn på BRD og bakterien *V. tapetis*. Skall fra flere av skjellene hadde tegn som tydet på at de hadde gjennomgått en BRD-prosess. Fra ett skjell (*R. philippinarum*) med BRD symptomer ble det isolert et bakterieisolat kalt NRP45 (Norsk *Ruditapes philippinarum*, isolat nr. 45), som ved innledende undersøkelser (*Vibrio tapetis* spesifikk PCR og PCR og sekvensering med generelle primere for gensegmenter som koder for 16S rRNA, *GyrB* og *Cpn60*) ble antatt å være et *V. tapetis* – isolat (Paillard C, pers. medd.).

Vi ønsket med dette arbeidet å sammenlikne *V. tapetis* isolatene fra skjell; NRP45 og CECT 4600 med *V. tapetis* isolatet LP2, fra grønngylt. Med bakgrunn i observasjoner som tyder på at grønngylt er følsom for lave temperaturer, og rapporter fra oppdrettere som melder om store tap av leppefisk i merdene både vinter og sommer, ønsket vi også å se på om forskjellige temperaturer - fra vinter til sommertemperatur - ville påvirke dødeligheten til grønngylt i smitteforsøk / fangenskap etter smitte med *V. tapetis* LP2.

Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å få økt kunnskap om *Vibrio tapetis* isolatene LP2, CECT 4600 og NRP45 sin rolle i forbindelse med død og sykdom hos grønngylt. Vi ønsket å se på:

1. Om *Vibrio tapetis*-isolatene LP2, CECT 4600 og NRP45 kan gi sykdom hos grønngylt, og om det dermed kunne være kryssmitte mellom skjell og grønngylt.
2. Om temperaturforhold kan påvirke dødeligheten forårsaket av *Vibrio tapetis* hos grønngylt.

MATERIALE OG METODE

Forsøksfasiliteter og forsøksfisk

I forsøkene ble det benyttet villfangede grønnngylt (*Symphodus melops*) med vekt på 10 – 115 gram. Fiskene ble fanget i ruser av en lokal fisker i Lysefjorden (60 °13'N, 5 °20'Ø).

Grønnngyltene ble hentet inn i fire omganger, til totalt fire forsøksoppsett, i tidsperioden juni 2004 til september 2005. Fiskene ble fanget på grunt vann på forskjellige lokaliteter i Lysefjorden. Temperaturforholdene ved de forskjellige fangststedene er ikke kjent. For hvert forsøk ble fisken samlet og transportert til Havforskningsinstituttet i Bergen, der de umiddelbart ble overført med våthov til de respektive forsøkskarene. Deler av grå pvc-rør, 8 cm i diameter og ca. 20 - 25 cm lange, ble lagt ut i karene som skjul for fiskene (se figur 3). Lys - regimet var 12 timer dag / 12 timer natt.



Figur 3. Grønnngylt i forsøkskar med pvc-rør som skjul.

Temperatur, karstørrelse og vanngjennomstrømming i forsøkskarene er beskrevet under hvert forsøk. Fiskene i alle forsøkene ble tilbudt fôr (3 mm Europa 15, Skretting) en gang daglig, fra dagen etter smittebelastning.

Bakterier benyttet ved smitte

Tre bakteriestammer ble benyttet i smitteforsøkene:

1. *Vibrio tapetis* typestamme CECT 4600, opprinnelig isolert fra det asiatiske teppeskjellet *Ruditapes philippinarum* (Landéda Frankrike) i laboratoriet ved Universitetet i Brest i 1990 (Paillard og Maes 1990), karakterisert og navngitt som *V. tapetis* av Borrego m. fl. (1996).
2. *V. tapetis* LP2, opprinnelig isolert fra grønngylt, *Symphodus melops*, og karakterisert ved Molekylærbiologisk laboratorium ved Havforskningsinstituttet i Bergen i september 2000 (Jensen m. fl. 2003).
3. *V. tapetis* NRP45, opprinnelig isolert fra *Ruditapes philippinarum* fra Espevik på Tysnes, sør for Bergen. Bakterien ble isolert i 2003 og karakterisert ved Molekylærbiologisk laboratorium ved Havforskningsinstituttet i Bergen i 2007 (Paillard m. fl. 2008).

Vekstmedier

Bakteriestammene ble oppbevart i en suspensjon av 0,8 ml bakteriekultur i Marine Broth (Difco) og 0,2 ml autoklavert glyserol (Merck KgaA, Darmstadt, Tyskland) i 1,8 ml Cryorør (Nunc Cryo Tube™ Vials, Nalgene, Nunc International, Danmark) i frys ved -80 °C.

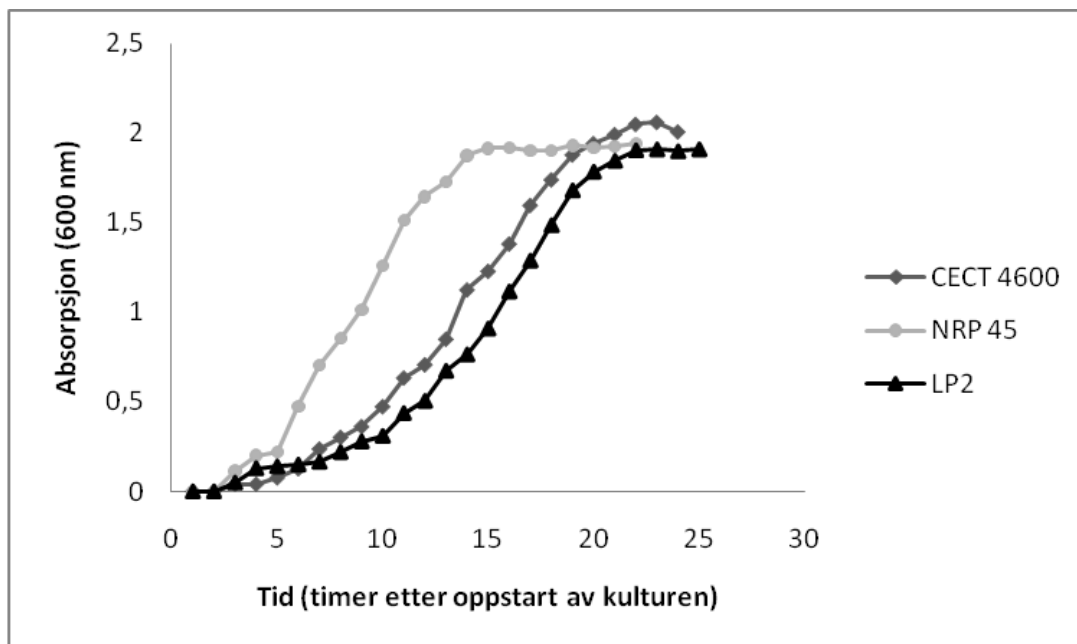
Som faste medier ble det benyttet Marin Agar (MA) (Difco) og Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) (MERCK). Tryptone Soya Broth (TSB) (Difco) ble benyttet som flytende medium (for mer informasjon om mediene, se Vedlegg A). Mediene ble laget etter produsentens anbefalinger, med unntak av TSB - mediet, hvor saltkonsentrasjonen ble justert fra 0,5 % til 1,5 % ved å tilsette 10 gram ekstra NaCl per liter medium.

Vekstkurver og oppdyrking av bakterier før smitte

For å beskrive vekstforløpet til bakterieisolatene LP2, CECT 4600 og NRP45 før smitteforsøket, ble det laget en vekstkurve for hver bakterie. En vekstkurve gir et bilde av sammenhengen mellom absorpsjonsverdi og kimtall ("Colony forming units (CFU)" $\times \text{ml}^{-1}$), og er et nødvendig verktøy for å kunne planlegge når smittekulturene ville være i eksponensiell vekstfase, og dermed være klare til bruk i smitteforsøkene.

Ved oppdyrking av bakterier til vekstkurvene, ble et lite avskrap fra frosne bakteriekulturer overført med steril podenål (5 μl inoculation loop, Nunc) til MA, og inkubert ved 18 °C i 48 timer. Flytende kulturer ble så laget ved å pode over bakteriekolonier fra MA til TSB. Dette flytende mediet ble foretrukket fremfor Marine Broth (MB), fordi det i motsetning til MB er klart, uten partikler/grums, som kan gi bakgrunnsstøy ved målinger av absorpsjon i spektrofotometeret. Prøver til spektrofotometrisk bestemmelse ble analysert i et Hitachi U-1100 Spectrophotometer ved 600 nm. TSB medium ble benyttet som blank. Flytende bakteriekulturer ble dyrket i risteinkubator (Infors AG CH - 4103) ved 200 rpm ved 18 °C. Absorpsjonsverdiene ble avlest fra én til 25 timer etter oppstart av bakteriekulturene. Ved de forskjellige absorpsjonsverdiene, ble det ved utvalgte målinger i perioden fra slutten av lagfasen, gjennom den eksponentielle fasen og til starten av den stasjonære fasen, tatt ut prøver for beregning av kimtall. Kimtallsberegninger ble utført ved at det fra tifolds fortyningsserier av bakteriekulturene i PBS ble tatt ut 2 \times 100 μl bakteriesuspensjon fra fortyninger på henholdsvis 10^{-5} , 10^{-6} og 10^{-7} , og platet ut på duplikate MA - skåler. Skålene ble inkubert ved 18 °C i 48 timer. Antall kolonier på hver skål ble så talt, og et gjennomsnittlig kimtall for skålene i hver fortykning ble bestemt. Vekstkurvene for de tre bakteriene benyttet i smitteforsøkene er vist i figur 4. Verdier for vekstkurvene er vist i vedlegg D, tabell D1-3.

For oppdyrking av flytende bakteriekulturer til smitteforsøkene ble det, som for vekstkurvene, benyttet TSB. Det ble først laget forkultur (30 ml i 100 ml erlenmeyerkolbe) av de aktuelle bakteriene. Absorpsjonsverdier for kulturer og mengde inokulum som ble overført fra forkultur til hovedkultur, er beskrevet for hvert forsøk.



Figur 4. Vekstkurver for smittebakteriene *V. tapetis* CECT 4600 og LP2 og NRP45 ved oppdyrking i TSB. Kurvene viser kulturenes absorbans ved 600 nm over tid (fra starten av inkubering og i 25 timer).

Bakteriekulturene ble dyrket opp i 500 ml TSB i én liters erlenmeyerkolber, under samme vekstbetingelser som for vekstkurvene. Før hvert smitteforsøk ble de respektive bakteriekulturene samlet i fem liters sterile flasker (Pyrex®, England) for å produsere en felles smittekultur for hver bakteriekultur. Absorpsjonsverdien i smittekulturene ble målt, og bakteriekonsentrasjonene ble estimert ut fra verdier fra vekstkurvene. De forskjellige smittedosene ble fortynnet på grunnlag av dette estimatet. Ved tidpunkt for igangsetting av smitte, ble det tatt ut 1ml fra kulturene til oppsett av fortynningsrekker og umiddelbar utplating på MA. Endelig kimtall (CFU x ml⁻¹) i de benyttede smittekulturene ble, på samme måte som for vekstkurvene, beregnet etter telling av kolonier fra utplatingene etter 48 timer.

Smittning av fisk ved bad og injeksjon

Ved badsmitte ble smittekulturene satt i beholdere med is til smitten startet, for å stagnere veksten til bakteriene. Smittebelastningen ble utført innen en time. Ved badsmitte ble vannet i smittekarene tappet ned til 30 eller 50 liters volum, alt etter karstørrelsen (se beskrivelse av hvert forsøk), og bakteriekultur ble tilsatt. Gjennom smitteperioden ble vannforsyningen slått av og karene ble tilført boblende luft. Fiskene ble holdt i bakteriesuspensjonen i én time,

hvoretter vanntilførselen ble slått på og lufttilførselen avsluttet. Kontrollgruppene ble behandlet tilsvarende, men fikk kun tilsatt TSB. I alle forsøkene ble kontrollgruppene behandlet først.

Ved stikksmitte ble 20 ml av smittekulturen sentrifugert i en Heraeus Biofuge pico ved 1000 x g, og resuspendert tre ganger i sterilt PBS. Smittedosene ble så fortynnet i PBS til ønsket konsentrasjon. De klargjorte smittedosene, og steril PBS til injisering av kontrollfisk, ble lagt på is for å hemme bakterievekst til injiseringene ble gjennomført (innen 30 minutter). Fiskene ble hovet over i bøtter med sjøvann. En fisk om gangen ble injisert intraperitonealt. De ble så umiddelbart ført tilbake til sine respektive kar. Kontrollfiskene ble injisert først.

Prøvetaking av forsøksfisk

Ved hver ankomst av fisk til forsøkene, ble det tatt prøver fra fisk til bakteriologisk dyrking, for å undersøke fiskene med hensyn på eventuell bakteriemi. I forsøk 1 og 2 ble det tatt prøver fra 10 fisk før hvert forsøk, og i forsøk 3 ble det tatt prøver fra totalt 60 fisk før forsøket.

All fisk som ble benyttet i forsøkene, ble lengdemålt, veid og kjønnsbestemt ved død, eller ved avliving i forbindelse med forsøksslutt. Unntaket var kontrollfiskene i forsøk 1, der kun åtte av de overlevende fiskene ble veid, målt og kjønnsbestemt. Totallengden for grønnngylt ble målt i cm og vekt ble målt til nærmeste 0,1 gram. Kjønnen ble bestemt både ut fra fargetegninger på kroppen og ved visuell undersøkelse av gonadene.

Ved avliving i forbindelse med prøvetaking av fiskene i forsøk 1, ble det først benyttet en overdose bezokain ($50 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$). Det ble imidlertid registrert store indre blødninger og rennende nyre hos fisk som ble avlivet på denne måten. På grunn av fare for kontaminering ved bakterieutstryk fra nyre, ble avlivingsmetoden for fisk som skulle til bakteriologisk dyrking endret. Fiskene ble i stedet avlivet ved stikk i hjernen med syl. Indre organer var da intakte ved obduksjon. Figur 5 viser forskjell i indre organer hos fisk som har vært utsatt for de to avlivingsmetodene. Overlevende fisk som det ikke ble tatt nyreutstryk fra, ble ved forsøksslutt avlivet med en overdose benzokain.



Figur 5. Obduserte grønngylt som er avlivet med to forskjellige metoder. Den fremste av fiskene ble avlivet med en overdose benzokain, mens den bakerste fisken er avlivet ved stikk i hjernen med syl. Bildet illustrerer hvordan fisken som er avlivet med benzokain har indre blødninger, mens fisken som er avlivet med syl ikke har disse blødningene.

Underveis i forsøkene ble dødelighet notert, og død fisk ble fjernet fra karene daglig. For prøvetaking og undersøkelse med hensyn på patologi, ble fiskene åpnet med sterile knivblad, og organer ble fjernet med spritvasket og avbrent disseksjonsutstyr for å blottlegge nyren. Det ble tatt bakterieprøver fra hodenyren hos døde og døende fisk og fem overlevende fisk i alle forsøksgruppene ved forsøksslutt. Prøvetakingen ble utført med sterile engangsøser (10 μ l inoculation loop, Nunc), som ble strøket ut på MA og TCBS.

Smitteforsøk med grønnlylt

Det ble utført tre smitteforsøk:

Forsøk 1 ble utført for å få en indikasjon på hvilken smittemåte (bad / intraperitoneal injeksjon (ip)) og smittedose som var best egnet for å smitte grønnlylt med *Vibrio tapetis*. Forsøket ble utført som en innledende studie, der det ble utført ip- og badsmitte ved tre forskjellige konsentrasjoner av smittebakterien. I dette forsøket ble *Vibrio tapetis* - isolatet LP2 benyttet som smittebakterie.

Forsøk 2 ble utført for å undersøke om temperaturen kan ha innvirkning på dødeligheten til grønnlylt i smitteforsøk. I dette forsøket benyttet vi også *Vibrio tapetis* - isolatet LP2 som smittebakterie.

I forsøk 3, ble grønnlylt smittet med *V. tapetis* LP2 og CECT 4600 og NRP45. Vi ønsket i dette forsøket å undersøke om også skjellisolatene CECT 4600 og NRP45 kunne gi sykdom hos grønnlylt. Forsøket ble utført ved to ulike temperaturer (12 og 15 °C). På grunn av kapasitetsbegrensninger på smittelaboratoriet måtte forsøket utføres i to omganger.

Forsøk 1. Bad- og ip - smitte med *V. tapetis* LP2

Forsøket ble utført i perioden 15. juni – 28. juli. Totalt 160 fisk ble fordelt i åtte grupper, med 20 fisk i hvert kar. Tre grupper pluss en kontrollgruppe ble badsmittet, og tre grupper pluss en kontrollgruppe ble smittet ved injeksjon i buken. Fiskene hadde en gjennomsnittsvikt på 39,4 gram, med et spenn på 11-114 gram. Det ble benyttet 160 liters kar, med en vanngjennomstrømming på 6 liter x min⁻¹. Temperaturen var 9 °C da fisken ankom karene, og ble økt til 12 °C før smitte.

Ved badsmitte ble vannet i karene tappet ned til 30 liter, og det ble tilsatt bakterier i karene til smittekonsentrasjoner på henholdsvis 4,7 x 10⁴, 4,7 x 10⁵ og 4,7 x 10⁶ CFU x ml⁻¹. Kontrollkaret ble tilsatt TSB medium.

Injiserte smittegrupper ble injisert intraperitonealt med 0,2 ml bakterieløsning, med smittedoser på henholdsvis 7,5 x 10², 7,5 x 10⁴ og 7,5 x 10⁶ CFU x ml⁻¹, som ble tillaget som beskrevet i avsnittet "Smitte av fisk ved bad og injeksjon" side 25. Kontrollgruppen ble injisert med 0,2 ml steril PBS. Fremgangsmåte for tillaging av bakterieløsning (smittebatch) for bad- og

stikkmitte er vist i tabell 1. Forsøket ble avsluttet 42 dager etter smitte. Basert på resultatene fra forsøk 1, valgte vi å bruke badsmitte i de følgende forsøkene.

Tabell 1. Absorpsjonsverdier ved 600 nm i forkultur, mengde inokulum fra forkultur til bakteriekulturer, absorpsjonsverdi i oppsamlet smittekultur og bakteriekimantall i smittekultur beregnet ut fra telling av bakterier på skålene etter utplating på MA.

A_{600} i forkulturen	1,04
Inokulum til bakteriekulturene	2 % (10 ml til 500 ml bakteriekultur)
A_{600} i smittekultur	1,47
CFU i smittekultur x ml ⁻¹	$4,7 \times 10^8$

Forsøk 2. Smitte med *V. tapetis* LP2 ved økende temperatur

Forsøket ble utført i perioden 2. juni - 23. juni. Totalt 480 fisk ble delt inn i fire duplikate grupper og fire kontrollgrupper (én for hver temperatur), med 40 fisk i hvert av til sammen 12 kar.

Fiskene hadde en gjennomsnittsvekt på 38 gram, med et spenn på 14 - 115 gram. Det ble benyttet 220 liters kar, som hadde en vanngjennomstrømning på 8 liter x min⁻¹.

Vanntemperaturen i karene var 9 °C da fiskene ankom karene, og ble regulert til henholdsvis 6, 9, 12 og 15 °C før smitte.

Ved smitte ble vannet i karene tappet ned til 50 liter og tilsatt bakterier til en konsentrasjon i smittekarene på 3×10^7 CFU x ml⁻¹. Tillaging av smittekultur og smittedoser ble utført som vist i tabell 2. Kontrollkarene ble tilsatt 500 ml TSB medium.

Tabell 2. Absorpsjonsverdier ved 600 nm i forkultur, mengde inokulum fra forkultur til hovedkulturer, absorpsjonsverdi i oppsamlet smittekultur og bakteriekimantall i smittekultur beregnet ut fra telling av bakterier på skålene etter utplating på MA.

A_{600} i forkulturen	1,19
Inokulum til bakteriekulturene	2 % (10 ml til 500 ml hovedkultur)
A_{600} i smittekultur	1,9
CFU i smittekultur x ml ⁻¹	$3,0 \times 10^9$

Forsøket ble avsluttet 26 dager etter smitte. Dødelighet ble registrert underveis, og døde fisk ble fjernet fra karene daglig. Bakteriedyrking fra nyre ved forsøkslutt ble utført som i forsøk 1, men fem av de overlevende fiskene i hver gruppe som skulle til bakteriologisk dyrking, ble fryst ved -20 °C, før dyrking ble foretatt etter to uker.

Identifisering av bakterier i smitteforsøkene

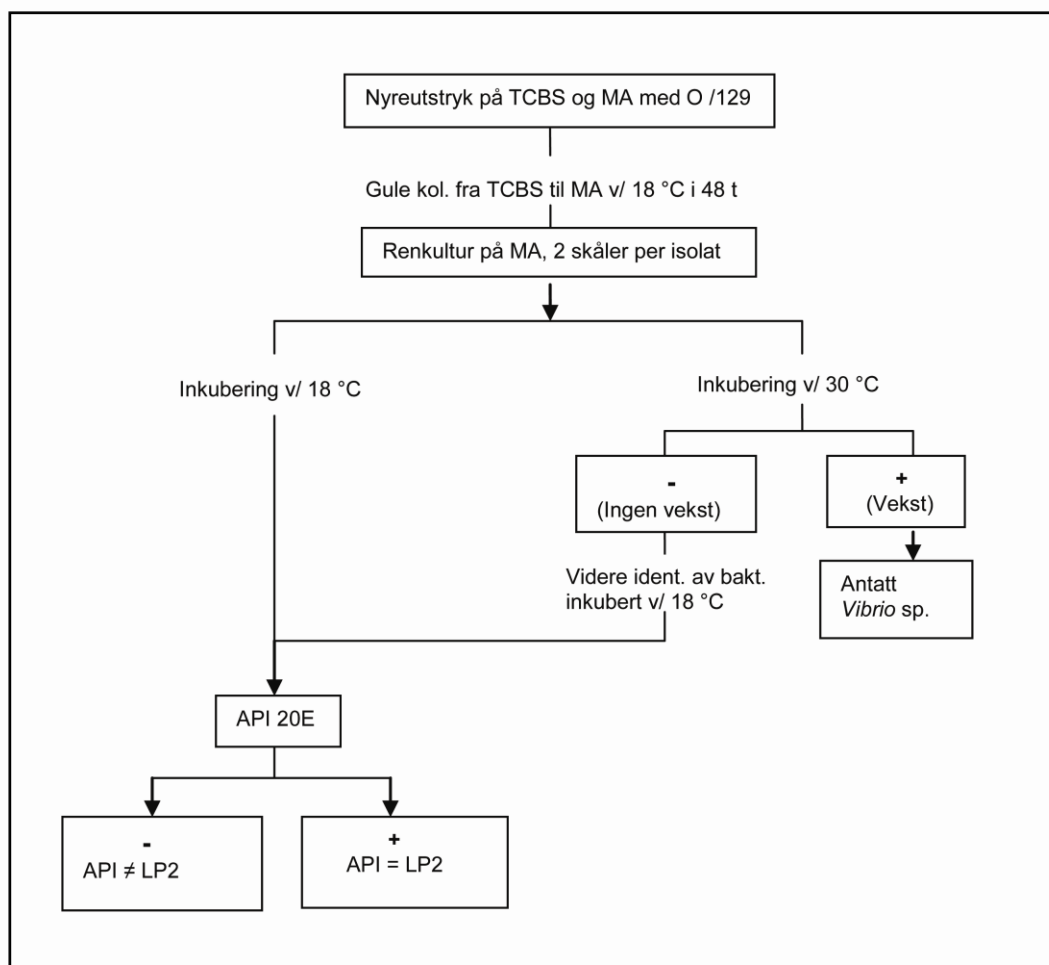
API 20-E (Bio Mérieux, Marcy l’Etoile, France), ble benyttet til fenotypisk identifikasjon av bakterieisolater fra fisk i forsøkene. For å verifisere metoden ble denne testen først utprøvd på smittebakteriene, også for at vi skulle få etablert en referanse. Dersom kolonimorfologi og API-mønsteret til bakterier isolert fra hodenyre hos fisk i forsøkene samsvarte med smittebakteriens, ble det antatt at smittebakterien ble reisolert. Karbohydratmetabolisme og enzymaktivitet til smittebakteriene LP2, CECT 4600 og NRP45 ved bruk av API 20E er vist i tabell 3.

Tabell 3. Undersøkelser av karbohydratmetabolisme og enzymaktivitet ved bruk av API 20-E, til smittebakteriene *V. tapetis* CECT 4600, LP2 og NRP45.

Substrat	Reksjon /enzym	CECT 4600	LP2	NRP45
ONPG (Ortho-Nitro-Phenyl-β-D-Galactopyranoside)	β-galactosidase	+	+	+
ADH (Arginine)	Arginine dihydrolase	-	-	-
LDC (Lysine)	Lysine decarboxylase	-	-	-
ODC (Ornithine)	Ornithin decarboxylase	-	-	-
CIT (Sodium Citrate)	Citrat utilization	-	-	-
H ₂ S (Sodium Thiosulfate)	H ₂ S produksjon	-	-	-
URE (Urea)	Urease	-	-	-
TDA (Tryptofan)	Tryptofan deaminase	-	-	-
IND (Tryptofan)	Indole produksjon	-	+	+
VP (Sodium Pyruvate)	Acetoin produksjon	-	-	-
GEL (Gelatin)	Gelatinase	-	-	-
GLU (Glucose sjekk)	Fermentering av glucose	+	+	+
MAN (Mannitol)	Fermentering av mannitol	-	-	+
INO (Inositol)	Fermentering av inositol	-	-	-
SOR (Sorbitol)	Fermentering av sorbitol	-	-	-
RHA (Rhamnose)	Fermentering av rhamnose	-	-	-
SAC (Sucrose)	Fermentering av sakkarose	-	+	-
MEL (Melbiose)	Fermentering av melbiose	-	-	-
AMY (Amygdalin)	Fermentering av amygdalin	-	-	+
ARA (Arabinose)	Fermentering av arabinose	-	-	-

Ved dyrking av bakterier fra nyreutstryk, ble det vibrioselektive mediet TCBS benyttet som primærmedium. Det ble også strøket ut parallelt på en MA skål, og tilsatt en lapp mettet med 10 µl av en løsning med vibriostatikum 0/129 (2,4 - diamino 6,7 - diisopropylpteridine)(Merck). Da *Vibriobakterier* er følsomme for vibriostatikum 0/129, kan denne metoden benyttes for å differensiere *Vibriobakterier* fra Enterobacteriaceae og Aeromonas. MA - skålen ble derfor kun benyttet som en kontroll på om det i prøvene kunne være tilstede bakterier som vokste uten hemningssone på vibriostatikum 0/129, og dermed ikke var *Vibrio* spp. Videre bearbeidelse av bakterieisolater ble utført fra TCBS - skålene.

LP2 fermenterer saccharose (se tabell 3), og vokser derfor med gule kolonier på TCBS-agarskålene (se vedlegg A, side 1). Det ble derfor selektert på gule kolonier, som ble podet om på to parallelle MA skåler, og inkubert ved 18 og 30 °C. Da *V. tapetis* ikke vokser ved høyere temperatur enn 27 °C (Paillard m. fl. 2004; Paillard C, pers. medd.), ble kun isolatene som vokste ved 18 °C, men ikke ved 30 °C, valgt ut for videre identifikasjon ved hjelp av API 20-E. Ved oppvekst av bakterier på skålene ble mengde bakterier delt inn i tre kategorier, der oppvekst av 1 - 10, 11 - 50 og mer enn 51 kolonier, ble definert som henholdsvis sparsom, middels rikelig og rikelig vekst av bakterier. En oversikt over gangen i identifikasjon av isolatene er vist i figur 6, og beskrivelse av kolonifarge og bakteriemengde på skålene er vist i vedlegg C.



Figur 6. Flytdiagram som viser trinnvis prosedyre for identifisering av *Vibrio*-isolater fra grønnlyt smittet med *V. tapetis* LP2. Alle bakterieisolater som vokste på det *Vibrio* - selektive mediet TCBS, og ga positiv reaksjon på vibriostat agent O/129, ble antatt å være *Vibrio* spp. Det ble kun utført API 20-E test på bakterier som vokste ved 18 °C, men ikke ved 30 °C. Bakterieisolater som viste samsvar med API mønster til den opprinnelige smittebakterien, ble tolket til å være *V. tapetis* LP2.

API 20-E-brettene ble tilsatt en bakteriesuspensjon av bakterier oppdyrket på MA ved 18 °C i 48 timer. API 20-E testen ble utført i henhold til produsentens manual, med noen modifiseringer: bakteriene ble løst opp i 0,9 % autoklavert NaCl til en tetthet tilsvarende McFarland No.2 før tilsetning på API 20-E-brettene. Brettene ble inkubert ved 18 °C i 48 timer. Testene ble avlest som beskrevet i manualen. Det ble også utført Oxidasetest (Bactident®) (MERCK). Oxidasetesten er en indikator for om en bakterie inneholder enzymet cytochrome oxidase. *V. tapetis* inneholder dette enzymet, og vil gi positivt resultat ved Oxidastest (Paillard m. fl. 2004) (for beskrivelse av oxidasetesten, se vedlegg A).

Forsøk 3. Smitte med LP2, CECT 4600 og NRP45 ved 12 °C og 15 °C

Forsøket ved 12 °C ble utført i perioden 10. – 30. september 2004, mens 15 °C - forsøket ble utført i perioden 1. juli - 25. juli 2005.

I forsøket ved 12 °C, ble totalt 400 fisk fordelt i åtte kar, med 50 fisk i hvert av karene. Ved 15 °C ble totalt 480 fisk fordelt i åtte kar, med 60 fisk i hvert av karene. I begge forsøkene ble det benyttet to kontrollgrupper og tre duplikate grupper som ble smittet med henholdsvis LP2, CECT 4600 og NRP45.

Fiskene i forsøket ved 12 °C, hadde en gjennomsnittsvikt på 42,5 gram, med et spenn fra 16-101 gram. Fiskene i 15 graders forsøket hadde en gjennomsnittsvikt på 35,2 gram, med et spenn fra 12 – 121 gram. Karene var på 220 liter, og hadde en vanngjennomstrømning på 10 l x min⁻¹.

Vanntemperaturen i karene var 9 °C da fisken ankom karene, og ble økt til henholdsvis 12 og 15 °C før smitte. Ved smitte ble vannet i karene tappet ned til 50 liter og tilsatt bakterier til konsentrasjoner i smittekarene som vist i tabell 4. Kontrollkarene ble tilsatt TSB medium. Fremgangsmåte for tillaging av de forskjellige smittekulturene til forsøkene ved 12- og 15 °C er vist i tabell 4.

Tabell 4. Absorpsjonsverdier ved 600 nm i forkultur, mengde inokulum fra forkultur til bakteriekulturer, absorpsjonsverdi i smittekulturer, CFU x ml⁻¹ i smittekulturer og i smittekarene.

12 °C	LP2	CECT 4600	NRP45
A ₆₀₀ i forkulturen	1,2	1,2	1,6
Mengde inokulum til hovedkulturer	2 % *	2 % *	2 % *
A ₆₀₀ i smittekulturer	1,2	1,2	1,7
CFU x ml ⁻¹ smittekulturer	5,5 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁸
CFU x ml⁻¹ i smittekarene	5,5 x 10⁶	1,0 x 10⁶	3,6 x 10⁶
15 °C			
A ₆₀₀ i forkulturen	1,6	1,8	1,4
Inokulum til hovedkulturer	2 % *	2 % *	2 % *
A ₆₀₀ i smittebatcher	1,9	1,7	1,8
Totaltall x ml ⁻¹ smittebatcher	1,8 x 10 ⁹	3,9 x 10 ⁸	4,04 x 10 ⁸
CFU x ml⁻¹ i smittekarene	1,8 x 10⁷	3,9 x 10⁶	4,04 x 10⁶

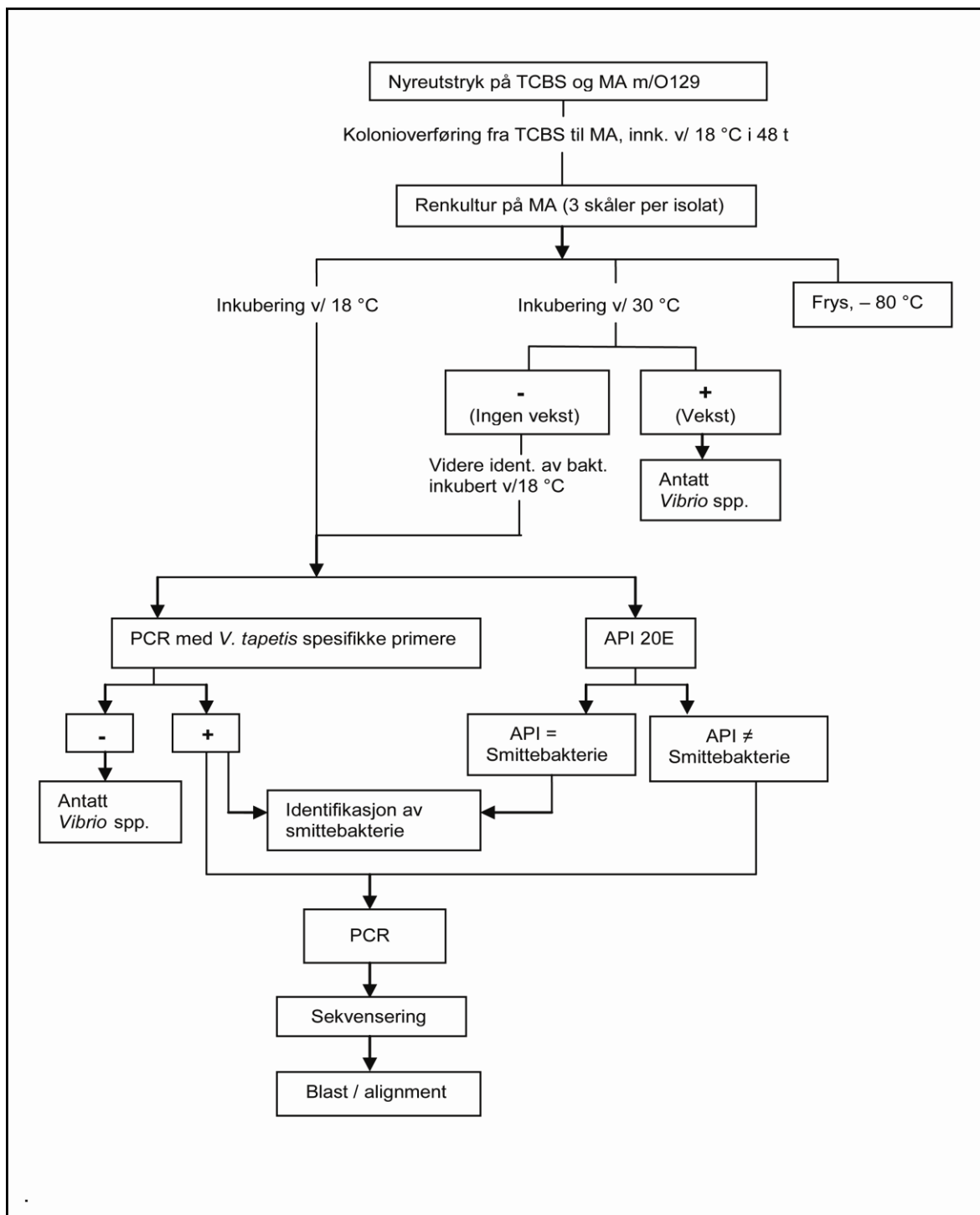
*10 ml til 500 ml hovedkultur.

Identifisering av reisolerte bakterier fra forsøk 3

Fenotypisk identifikasjon av bakterier fra fisk i dette forsøket ble utført som beskrevet for forsøk 1 og 2, men med noen endringer; da CECT 4600 og NRP45 er saccharose - negative i motsetning til LP2, som er saccharose positiv (se tabell 3) får disse bakteriene grønn kolonifarge på TCBS - agar (LP2 er gul). Derfor ble både gule og grønne kolonier isolert for videre identifikasjon. Ved videre identifikasjon ble det i tillegg til API 20E, utført PCR etter en metode etablert av Paillard m. fl. (2006), som spesifikt skal detektere *Vibrio tapetis* (heretter referert til som "*V. tapetis* PCR"). Flytskjema som viser fremgangsmåte for identifisering av bakteriene er vist i figur 7.

Fra forsøkene ved 15 °C, ble isolater med positiv *V. tapetis* PCR og avvikende API 20-E - profil i forhold til smittebakterien sekvensert (som beskrevet i figur 7)(16S rRNA-, *GyrB* og *Cpn60* - genene). Sekvensering ble utført for å undersøke om andre *V. tapetis* stammer enn smittebakteriene var blitt isolert (dvs. naturlige smittebærere). Fra forsøket ved 12 °C, ble i tillegg til beskrivelsene i figur 7, alle isolater fra døde fisk i smittegruppene som var positive med *tapetis* PCR, sekvensert. På isolater fra NRP og LP2 smittegruppene ble 16S rRNA- og *Cpn60* -genene sekvensert, fra CECT smittegruppen 16S rRNA-, *GyrB*- og *Cpn60* genene sekvensert, og fra døde fisk i kontrollgruppene 16S rRNA genet sekvensert.

Beskrivelsen av de molekylærbiologiske metodene blir beskrevet under neste kapittel / avsnitt.



Figur 7. Flytdiagram som viser trinnvis prosedyre for identifisering av *Vibrio*-isolater fra grønnlylt smittet med *V. tapetis* LP2, CECT 4600 og NRP45. Alle bakterieisolater som vokste på det *Vibrio*-selektive mediet TCBS, og ga positiv reaksjon på vibriostatic agent O/129, ble antatt å være *Vibrio* spp. Det ble kun utført PCR og API 20-E test på bakterier som vokste ved 18 °C, men ikke ved 30 °C. Bakterieisolater som ga positiv PCR - reaksjon, og som i tillegg hadde API - profil som samsvarte med API - profilen til smittebakterien, ble antatt å være reisolert smittebakterie. For noen av isolatene, som ga positiv PCR, men ikke hadde API mønster som samsvarte med bakterien fisken var smittet med, ble det satt opp ny PCR og sekvenseringsreaksjoner som beskrevet i teksten.

Molekylærbiologisk bestemmelse av de reisolerte bakteriene

Isolering av genomisk DNA fra bakteriekulturer

Isolering av genomisk DNA fra bakteriekulturer til PCR reaksjonen, ble utført ved å overføre bakteriekolonier til 1 ml TSB i 2,2 ml 96 brønners kulturbrett (Millipore). Bakteriekulturene ble inkubert ved 18 °C i 48 timer. Brettene ble sentrifugert ved 5500 x g ved 4 °C i en Qiagen 4-15 C sentrifuge (Sigma) i 10 min. Supernatantene ble fjernet og hver brønn ble tilsatt 200 µl ATL Tissue lysis buffer (Qiagen) og 20 µl proteinase K løsning (Qiagen). Brettene ble inkubert ved 55 °C og ristet ved 70 rpm over natt i en Hedolph UNIMAX 1010 inkubator. DNA ekstraksjon ble så utført ved hjelp av DNAeasy 96 Tissue Kit (Qiagen) i henhold til produsentens anbefaling. Kvantifisering av isolert DNA ble foretatt ved målinger i NanoDrop ND - 1000 Spectrophotometer (Saveen Werner), og prøvene ble fortynnet i deionisert vann for å få en DNA- konsentrasjon til PCR på omkring 50 ng /µl.

PCR med primere som er spesifikke for *Vibrio tapetis*

Primere og andre ingredienser til PCR løsningen er ført opp i tabell 5. PCR reaksjonene ble utført som beskrevet av Paillard m. fl. (2006), modifisert med et innledende denatureringstrinn ved 95 °C i 5 minutter, deretter 35 sykli med: denaturering ved 94 °C i 1 minutt, annealing ved 63 °C i 1 minutt og elongering ved 72 °C i 45 sekunder. Til slutt fulgte en siste elongering ved 72 °C i 10 minutter for å fullføre reaksjonene. Reaksjonen ble utført i en GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystem). Positiv kontroll var DNA fra *V. tapetis* CECT 4600, mens den negative kontrollen var nucleasefritt vann.

Tabell 5. Innhold i PCR-reaksjonen med primere som er spesifikke for *V. tapetis*. Mengde reagenser er beregnet til 50 µl PCR løsning.

Ingredienser	Mengde per 50 µl	Sluttkonsentrasjon
10 x PCR-buffer	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	3 µl	1,5 mM
dNTPs mix (Promega) (1,25 mM av hver dNTP)	8 µl	0,2 mM av hver dNTP
VtF ¹ (10 mM stamløsn.)	2 µl	0,4 µM
VtR ² (10 mM stamløsn.)	2 µl	0,4 µM
Taq polymerase (5 U x µl ⁻¹) (Promega)	2 µl	0,2 U µl ⁻¹
Nuclease fritt vann	24 µl	
DNA templat (ca 50 ng / µl)	4 µl	

1) 5' CGAGCGGAAACGAGAAGTAG 3' (Paillard m. fl. 2006).

2) 5' GGATGCACGCTATTAACGTACA 3' (Paillard m. fl. 2006).

Påvisning av PCR-produkt etter bruk av *V. tapetis* spesifikke primere ved gelelektroforese

Agarosegelelektroforese ble benyttet for å separere DNA-fragmenter, slik at de kunne visualiseres. Det ble applisert 6 µl PCR produkt blandet med 2 µl 6x gel loading – buffer (Trackit cyan / orange loading buffer 6 x (Invitrogen)) over i brønner på en 1 % agarosegel med 0,5 x TBE-buffer. Trackit 100 bp DNA ladder (Invitrogen), ble brukt som markør. Gelen ble kjørt i elektroforesekar (BIO-RAD Wide-mini SUBCELL) i 0,5 x TBE-buffer. Elektroforesen ble kjørt ved 75 V til prøvene hadde vandret ca $\frac{3}{4}$ over gelen, dette tok ca. 60 minutter. Gelen ble så lagt i etidiumbromidbad (Bio-Rad Ethidium Bromide solution, 10 mg x ml⁻¹) med en konsentrasjon på 0,05 µg x ml⁻¹ i destillert vann i 10 minutter, og DNA bånd ble visualisert i UV-lys og fotografert (Syngene GeneGenius Bio Imaging Systems).

PCR med generelle primere for bakterier

Det ble innledningsvis forsøkt å sekvensere produkter fra den spesifikke PCR – testen, men det var ikke mulig å skille mellom *Vibrio* spp. etter sekvensering ved bruk av disse primerne, da sekvensene var for korte (ca 420 basepar), og inneholdt lite variasjon. Det ble derfor utført PCR med generelle bakterieprimere. Det ble benyttet primere for gensegmenter som koder for 16S rRNA, gyraseB protein (GyrB) og chaperonin 60 protein (Cpn60). Primerne som ble benyttet er vist i tabell 6. Innhold i PCR-løsningene og PCR-reaksjonene er vist i tabell 7, 8, 9 og 10.

Tabell 6. Oversikt over nucleotidsekvensene benyttet til PCR - reaksjonene med universelle primere, rettet mot gensekvenser som koder for 16S rRNA, *GyrB* og *Cpn60*. (Primerretning: forward = F og revers = R). Symbolene M, N, Y og R, er i forkortelser i sekvensene forenlig med "The standard nucleotide symbol table" (medprobe), og symboliserer henholdsvis A+C, A+C+G+T, C+T og A+G.

Primere			
Navn	Sekvens (5'- 3')	Referanser	Produkt - størrelse
16S rRNA 27 F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Weisburg m. fl. (1991)	ca 1500 nucleotider
16S rRNA 1492 R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>GyrB</i> -1 F	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGNAARTTYGA	Yamamoto og Harayama 1995	ca. 1200 nucleotider
<i>GyrB</i> -2R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT		
<i>Cpn60</i> F1	GGNGAYGGNACNACNACNGCNACNGT	Rusaganawa m. fl. (1992)	ca. 600 nucleotider
<i>Cpn60</i> R1	TCNCCRAANCCNGGNGCYTTNACNGC		

Tabell 7. Innhold i PCR - løsningen for 16Sr RNA-gen. Mengde reagenser er beregnet til 20 µl PCR løsning.

Ingredienser	Mengde per 20 µl	Sluttkonsentrasjon
10 x PCR-buffer	2 µl	1 x
25 mM MgCl ₂	1,2 µl	1,5 mM
dNTPs mix (1,25 mM av hver dNTP)(Promega)	3,2 µl	0,2 mM av hver dNTP
27 F 10 mM	1 µl	0,4 µM
1492 R 10 mM	1 µl	0,4 µM
Taq polymerase (5 U x µl ⁻¹)(Promega)	0,2 µl	0,05 U µl ⁻¹
Nuclease fritt vann	7,4 µl	
DNA templat (ca 50 ng / µl)	4 µl	

Tabell 8. Innhold i PCR - løsningen for *Cpn60* - gen. Mengde reagenser er beregnet til 20 µl PCR løsning.

Ingredienser	Mengde per 20 µl	Sluttkonsentrasjon
10 x PCR-buffer	2 µl	1 x
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,88 mM
dNTPs mix (1,25 mM av hver dNTP)(Promega)	4 µl	0,25 mM av hver dNTP
<i>Cpn60</i> F1 (10 mM)	0,5 µl	0,4 µM
<i>Cpn60</i> R1 (10 mM)	0,5 µl	0,4 µM
Taq polymerase (5 U x µl ⁻¹)(Promega)	0,2 µl	0,05 U µl ⁻¹
Nuclease fritt vann	7,3 µl	
DNA templat (ca 50 ng / µl)	4 µl	

Tabell 9. Innhold i PCR - løsningen for *GyrB*-gen. Mengde reagenser er beregnet til 20 µl PCR løsning.

Ingredienser	Mengde per 20 µl	Sluttkonsentrasjon
10 x PCR-buffer	2 µl	1 x
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	1,88 mM
dNTPs mix (1,25 mM av hver dNTP)(Promega)	4 µl	0,25 mM av hver dNTP
<i>GyrB</i> -1 F (10 mM)	1 µl	0,5 µM
<i>GyrB</i> -2 R	1 µl	0,5 µM
Taq polymerase (5 U x µl ⁻¹)(Promega)	0,5 µl	0,125 U µl ⁻¹
Nuclease fritt vann	6 µl	
DNA templat (ca 50 ng / µl)	4 µl	

Tabell 10. PCR - reaksjoner for genene 16S rRNA, *GyrB* og *Cpn60*.

Fase	16S rRNA		<i>GyrB</i>		<i>Cpn60</i>	
	Temperatur	Tid (Minutter)	Temperatur	Tid (Minutter)	Temperatur	Tid (Minutter)
Denaturering	95 °C	5	95 °C	5	95 °C	5
Denaturering	94 °C	1	94 °C	1	95 °C	1
Annealing	55 °C	1	55 °C	1	58 °C	1
Elongering	72 °C	1	72 °C	2	72 °C	2
Siste Elongering	72 °C	10	72 °C	10	72 °C	7
	4 °C →		4 °C →		4 °C →	

DNA elektroforese av PCR - produktene etter bruk av generelle primere

For å fastslå om det var PCR-produkt til stede etter PCR - reaksjonene med de generelle primerne for bakterier, ble det benyttet 1,2 % "Ready-To-Run Agarose Gel" tilsatt ethidiumbromid (E-Gel, 96 Gels, Invitrogen, Carlsbad, California). I hver brønn ble det applisert 2,5 µl DNA-ekstrakt, og gelen ble kjørt ved 90 V i seks minutter. Båndene i gelen ble visualisert og vurdert ved hjelp av ultrafiolett lys i en BioRad GelDoc 2000.

Rensing av PCR-produkter til sekvensering

For å fjerne ubrukte primere og nukleotider fra PCR-produktet, slik at disse ikke skulle interferere på sekvenseringsprosessen, ble PCR-produktene rensed med "PCR product pre-sequencing kit" fra Amersham Pharmacia Biotech (produktnummer US70995). Prosedyren ble utført etter produsentens anbefaling.

Syklisk sekvenseringsreaksjon

De rensede PCR-produktene ble sekvensert ved hjelp av ABI Prism™ Big-Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems). Nukleotidsekvensene av de oppkopierte bakterielle 16S rRNA-, *GyrB*- og *Cpn60*-genene ble syklisk sekvensert basert på dideoxy-metoden til [Sanger m. fl.\(1977\)](#). Både forover og reverse primere ble benyttet for å sekvensere genene i begge retninger, for å få en overlappende og dermed lengre sekvens. For gensekvensering av 16S rRNA - og *Cpn60* - genene, ble det benyttet samme primere som ved PCR - reaksjonen. For *GyrB*-genet ble imidlertid følgende sekvenseringsprimere benyttet; *GyrB*-1S-forover (5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA-3'), og *GyrB*-2S revers (5'- AGC AGG GTA CCG ATG TGC GAG CC-3')([Yamamoto og Harayama 1995](#)). Sekvenseringsreaksjonene ble utført med

et reaksjonsvolum på 10 µl. Reagensene til de sykliske sekvenseringsreaksjonene er vist i tabell 11.

Tabell 11. Reagenser til 10 µl sekvenseringsreaksjoner for sekvensering av 16S rRNA-, *Cpn60*- og *GyrB*-gen. Tabellen viser mengde reagens (µl) som ble tilsatt per prøve. Benyttede primere er beskrevet i teksten.

Reagens	16S rRNA	<i>Cpn60</i>	<i>GyrB</i>
RNAse- fritt vann*	2,5	1,5	2,5
Big Dye 3,1 (2,5x)	1	1	1
Sekvenseringsbuffer (5,0 x)	1,5	1,5	1,5
Primer	2	2	2
Renset templat	3	4	3
Totalt	10	10	10

* Eppendorf, Hamburg, Tyskland

Sekvenseringsreaksjonene ble utført med et innledende denatureringstrinn ved 95 °C i 1 minutt, fulgt av 25 sykli med denaturering ved 96 °C i 10 sekunder, annealing ved 50 °C i 5 sekunder og elongering ved 60 °C i 4 minutter. Etter sekvenseringsreaksjonen ble hver prøve tilsatt 10 µl PCR-vann og fryst ved -20 °C inntil de ble sekvensert. Automatisk DNA sekvensering av produktet fra sekvenseringsreaksjonen ble analysert i en ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) ved Universitetet i Bergen, Norge.

Sekvensanalyser

De overlappende sekvensene av 16S rRNA - , *Cpn60* - og *GyrB* - genet ble satt sammen til komplette sekvenser ved hjelp av ContigExpress (InforMax, Fredrick, MA, U.S.A.)(Vektor NTI Advance 11 datapakke, Invitrogen). Sekvensene ble analysert ved hjelp av BLAST (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)), hvor likheter i sekvensene ble sammenlignet med andre bakterieisolater i databasen. Sammenstilling av sekvensene til de isolerte stammene ble foretatt ved hjelp av AlignX (Vector NTI), for å se på likhet med *V. tapetis*.

Da det var lite 16S rRNA gen variasjon mellom smittebakteriene, og sekvensene i genbank av disse inneholdt uavklarte posisjoner (N'er), ble disse stammene resekvensert. Karakteristiske tvetydige signaler i sekvensene, som var persistente i alle kromatogramlesningene, ble registrert da disse kunne være informative i diskriminering mellom isolater. Slike konsistente tvetydige signaler opptrer pga multiple kopier av 16S rRNA genet med forskjellig sekvens (se [Jensen m. fl. 2009 med referanser](#)).

Histologiske undersøkelser

Fra "svimere" i smittegruppene (kun et lite antall fisk), samt fem kontrollfisk før forsøksstart, ble det tatt ut vev fra nyre, milt og lever til histologiske undersøkelser. Fornyre og milt ble benyttet hele, mens det fra lever ble klippet ut 5 x 5 mm vevslesjoner ved hjelp av disseksjonssaks. Vevsbiter ble overført til 4 % bufret formalin. Etter vel en uke ble vevsbitene støpt i parafin, snittet til 3 μ m tykkelse, farget med hematoxylin - eosin (HE) og observert i et Leica DMRBE-mikroskop ved 100 til 1000 x forstørrelse.

Statistikk

Total dødelighet ved forsøkene avslutning ble analysert med G-test for heterogenitet ([Sokal og Rohlf 1995](#)). H_0 var alltid "ingen forskjell i dødelighet mellom gruppene", og H_0 ble forkastet ved $p > 0,05$. Dersom G - verdien for heterogenitet (G_H) var signifikant ($p < 0,05$), var dødeligheten heterogen og *post hoc* chi- square testing ble benyttet for å avklare hvilke(n) behandling(er) som var signifikant avvikende.

RESULTATER

Forsøksfisk

Alle fiskene – inkludert fiskene i kontrollgruppene – var passive og hadde dårlig appetitt under forsøkene. De viste også en nervøs atferd, og søkte raskt skjul i PVC - rørene i karene, når det var aktiviteter i nærheten av forsøkskarene (figur 8).



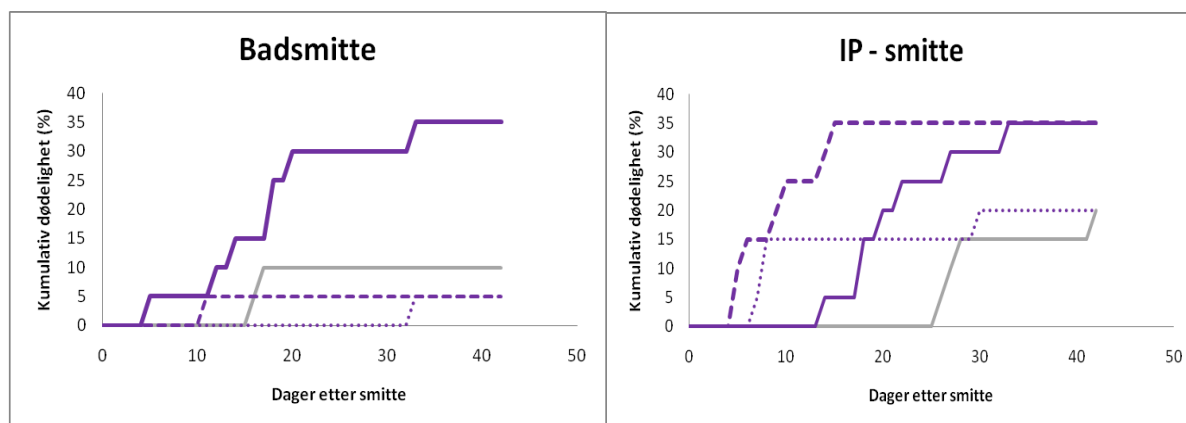
Figur 8. Foto av grønnngylt i forsøkskar som samler seg og søker skjul i PVC rør.

Forsøk 1. Bad- og stikksmitte med *V. tapetis* LP2

Dødelighet

I forsøk 1 var det totale antall fisk i hvert kar 20 stk, slik at hvert individ utgjorde 5 % ved beregning av kumulativ dødelighet. Ved badsmitte var dødeligheten signifikant høyest ved høyeste smittedose i forhold til de lavere dosene og kontrollgruppen ($p < 0,05$). Ved stikksmitte var dødeligheten signifikant høyest ved medium og høyest smittedose i forhold til lav dose og kontrollgruppen ($p < 0,05$).

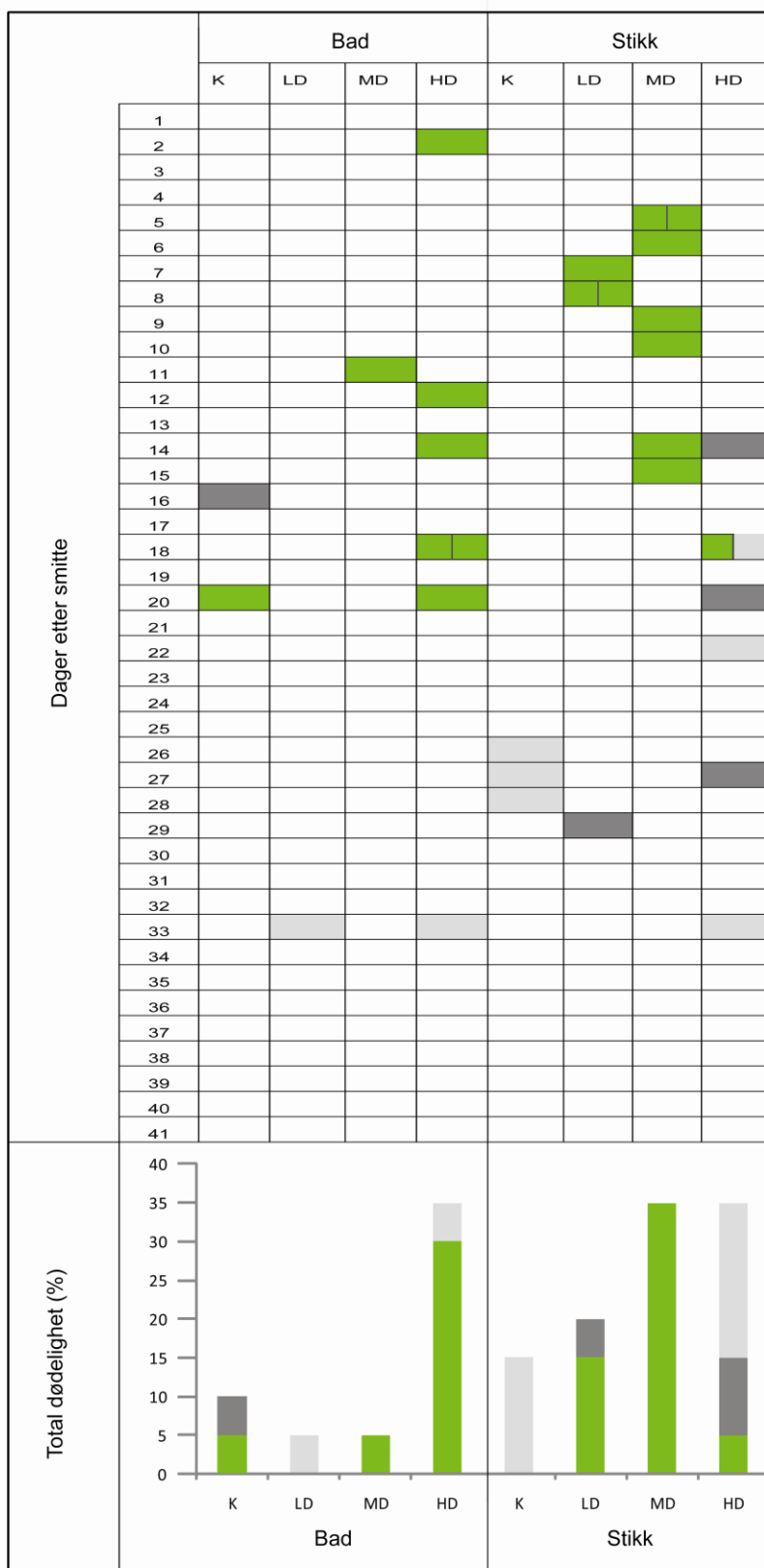
Innen de 20 første dagene etter smitte, ble 75 % av den totale dødeligheten registrert. Høyest, og identisk dødelighet (35 %), ble registrert ved høyeste dose bad og høyeste- og medium dose med ip-injeksjon (Figur 9 og 10). I de badsmittede gruppene ble den høyeste dødsraten registrert i perioden mellom dag 11 og 20, med unntak av én fisk som var smittet med høy dose, som døde dag to etter smitte, og to fisker ved henholdsvis lav og høy dose, der det ble registrert én død fisk i hver gruppe først 33 dager etter smitte. I gruppene som fikk ip - smitte, startet dødeligheten ved lav og middels dose tidligere enn ved badsmitte, ved henholdsvis dag 5 og dag 7. I gruppen som fikk høy dose, startet imidlertid dødeligheten betydelig senere enn i de andre smittegruppene (dag 14) (se Figur 9 og 10).



Figur 9. Kumulativ dødelighet av grønnngylt smittet ved 12 °C med *Vibrio tapetis* LP2 ved bad- og stikkssmitte i forsøk 1. Hver smittegruppe bestod av 20 fisk, slik at en død fisk utgjorde 5 % dødelighet. Forsøkets varighet var 42 dager. Ved stikkssmitte var dosene $7,5 \times 10^2$, $7,5 \times 10^4$ og $7,5 \times 10^6$, mens dosene ved badsmitte var $4,7 \times 10^4$, $4,7 \times 10^5$ og $4,7 \times 10^6$. Lilla linjer illustrerer smittegruppene, og grå linjer er kontrollgruppene. Heltrukne, lilla linjer er verdier for høyeste doser, stiplede linjer er medium dose, mens prikkete linjer er lav dose.

Isolering av bakterier fra forsøksfisk

LP2, identifisert ved API (Figur 6), ble isolert fra døde fisk i smittegruppene de 25 første dagene etter smitte, med unntak av gruppen som ble smittet med høyest ip - dose. Fra denne gruppen ble LP2 kun isolert fra én fisk i løpet av forsøket (se Figur 10). Fra de øvrige døde fiskene i denne gruppen ble det isolert *Vibrio* spp. (tre fisk) eller ikke påvist bakterier (tre fisk). Ved oppvekst av LP2, ble denne bakterien funnet i renkultur på skålene, i hovedsak med rikelig vekst (se Vedlegg C, Tabell C1). Fra dag 25 etter smitte ble det enten isolert andre *Vibrio* - arter enn LP2, eller det ble ikke påvist bakterier (Figur 10). Fra kontrollgruppene ble det ikke isolert bakterier i injeksjonsgruppen. Fra gruppen som ble badsmittet, ble det fra de to døde fiskene isolert henholdsvis *Vibrio* sp. og en *Vibrio* - bakterie med API - profil identisk med *V. tapetis* LP2. Ved dyrking fra nyre fra fem overlevende fisk i hvert kar, ble det ikke funnet bakterievekst.



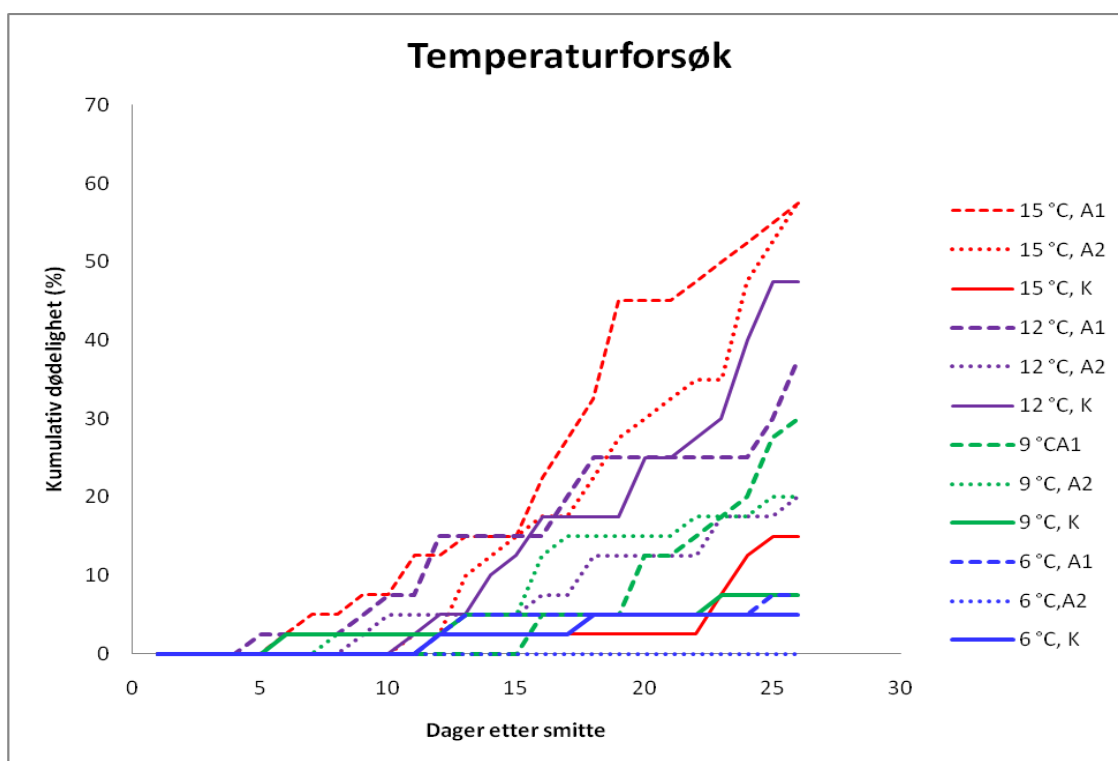
Figur 10. Dødelighet av grønnngylt i forsøk 1. I øverste del av tabellen gir fargete felt en oversikt over tidspunkt for dødeligheten i smittegruppene bad og ip (stikk) gjennom hele forøket. Hver farget rute i tabellen representerer én død fisk. Søylediagrammet nederst i figuren viser totalt antall døde fisk i forsøket i prosent. I figuren illustrerer grønn farge at vi har isolert LP2 fra død fisk, mørk grå illustrerer isolater som er identifisert som andre *Vibrio* spp, og lys grå farge viser døde fisk der vi ikke fikk oppvekst av bakterier.

Forsøk 2. Effekt av smitte med *V. tapetis* LP2 ved forskjellige temperaturer

Dødelighet

I forsøk 2 var det totale antall fisk i hvert kar 40 stk, slik at hvert individ utgjorde 2,5 % ved beregning av kumulativ dødelighet. Det ble i smittegruppene ved 6, 9, 12 og 15 °C, registrert økende dødelighet med stigende temperatur (henholdsvis 3, 20, 23 og 48 døde fisk).

Dødeligheten i de parallelle smittegruppene avvok ikke signifikant fra hverandre ($p > 0,05$) ved noen av temperaturene. Fisk i de parallelle forsøksgruppene ble derfor slått sammen før dødeligheten ved de forskjellige temperaturene ble sammenlignet statistisk. Dødeligheten ved 15 °C ble funnet å være signifikant høyere enn ved de lavere temperaturene (henholdsvis ($p < 0,05$) i forhold til 9 og 12 °C og ($p < 0,001$) i forhold til 6 °C. Dødeligheten ved 6 °C var signifikant lavest i forhold til ved 9 og 12 °C ($p < 0,05$) og i forhold til 15 °C ($p < 0,001$). Dødeligheten ved 9 og 12 °C var ikke signifikant forskjellige ($p > 0,05$).



Figur 11. Kumulativ dødelighet i prosent ved smitte med *Vibrio tapetis* LP2 ved 6, 9, 12 og 15 °C fra forsøksstart og frem til 26 dager etter smitte. A1 og A2 er parallelle grupper fra henholdsvis akvarium 1 og 2. K er kontrollgruppene.

Det var ikke signifikante forskjeller i dødeligheten i kontrollgruppene, bortsett fra ved 12 °C, hvor dødeligheten var høyere enn ved de andre temperaturene ($p < 0,05$). Ved 9 og 15 °C var

dødeligheten i kontrollgruppene signifikant lavere enn i smittegruppene. Ved 6 og 12 °C var dødeligheten imidlertid ikke forskjellig fra smittegruppene.

Isolering av bakterier fra forsøksfisk

Vibrio tapetis med API - profil lik LP2 (heretter "LP2") ble isolert fra døde fisk ved alle temperaturer, men ikke i kontrollgruppene (figur 12). *V. tapetis* LP2 ble reisolert fra flest fisk ved høyeste temperatur, signifikant flere ved 15 °C, enn ved 6 °C ($p < 0,001$). En oversikt over bakterier som ble isolert i forsøk 2, finnes i vedlegg C, tabell C2.

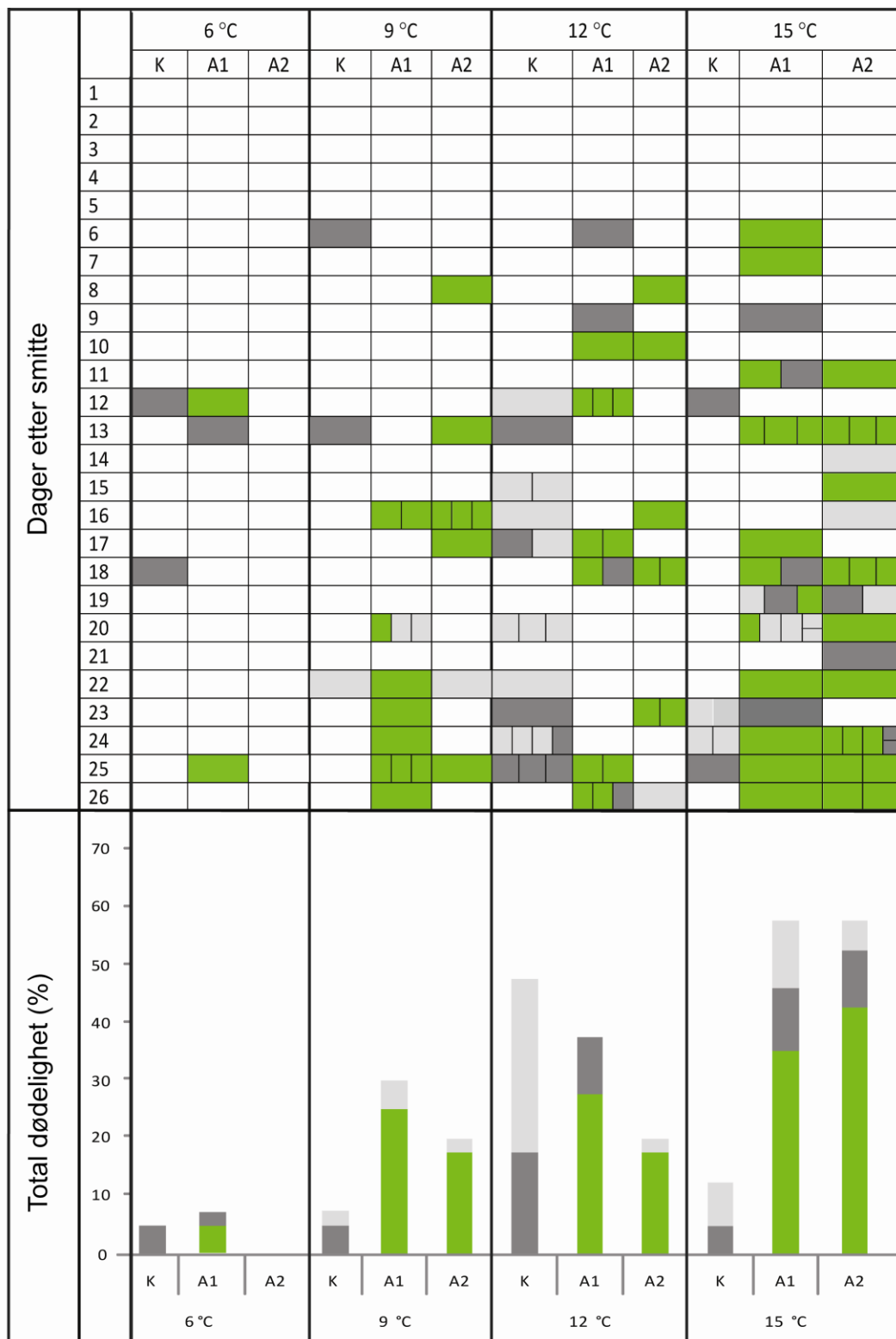
Ved 15 °C ble LP2 isolert fra 31 av de 48 fiskene som døde. Hos 23 av disse fiskene viste bakterien rikelig vekst i renkultur. Fra de øvrige fiskene hvor LP2 ble isolert, vokste bakterien i renkultur med sparsom eller middels rikelig vekst, eller i blandingskultur med andre *Vibrio* spp. Fra resten av de døde fiskene ble det funnet oppvekst av andre *Vibrio* spp. (ni fisk), eller det ble ikke påvist bakterier (åtte fisk, inkl. fem fisk som hadde vært fryst).

Ved 12 °C ble LP2 isolert fra 18 av de 23 fiskene som døde. Hos 14 av disse viste bakterien rikelig vekst i renkultur. Fra de øvrige fire fiskene, ble bakterien funnet i sparsom eller middels rikelig mengde, eller i blandingskultur med andre *Vibrio* spp. Fra fire fisk ble det kun isolert andre *Vibrio* spp., mens det fra én fisk ikke ble påvist vekst av bakterier.

Ved 9 °C ble det fra 18 av de 20 døde fiskene funnet oppvekst av LP2 i renkultur. Fra 13 av fiskene ble LP2 funnet i rikelig vekst, mens bakterien vokste med sparsom vekst fra fem fisk. Fra fire fisk ble det ikke påvist bakterier (inkl. to som hadde vært fryst).

Ved 6 °C ble det fra to av de tre døde fiskene funnet rikelig vekst av LP2 i renkultur. Fra en fisk ble det isolert en annen *Vibrio* sp.

Ved nyreutstryk fra fem av de overlevende fiskene i hver gruppe, ble det ved 6 °C funnet vekst av bakterier fra to fisk i kar A1, henholdsvis LP2 og *Vibrio* sp. Fra 15 °C ble det påvist LP2 fra én overlevende fisk i kar A1. Det ble ikke påvist bakterier fra fem av de overlevende fiskene i gruppene ved 9 og 12 °C, eller fra kontrollgruppene.



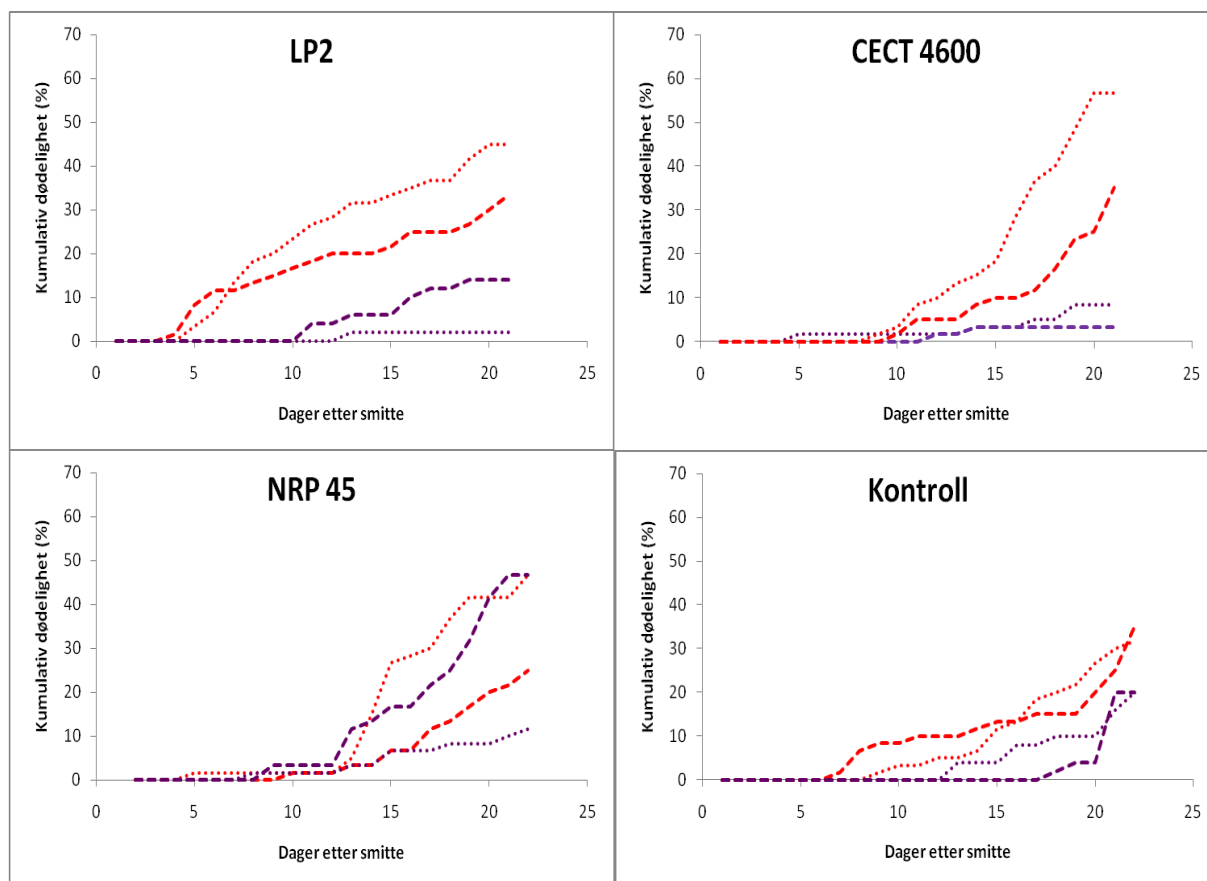
Figur 12. Dødelighet av grønnlyst smittet med *V. tapetis* LP2 ved 6, 9, 12 og 15 °C. I øverste del av tabellen gir fargete felt en oversikt over tidspunkt for dødeligheten i smittegruppene gjennom hele forsøket. Hver farget rute i tabellen representerer én fisk. Søylediagrammet nederst i figuren viser antall døde fisk i prosent. I figuren illustrerer grønn farge at vi har isolert LP2 fra død fisk, mørk grå illustrerer oppvekst av isolater som er identifisert som *Vibrio* spp, mens lys grå farge viser døde fisk hvor vi ikke fikk vekst av bakterier ved dyrking fra nyreprøve.

Forsøk 3. Smitte med isolatene CECT 4600, LP2 og NRP45 ved 12 °C og 15 °C

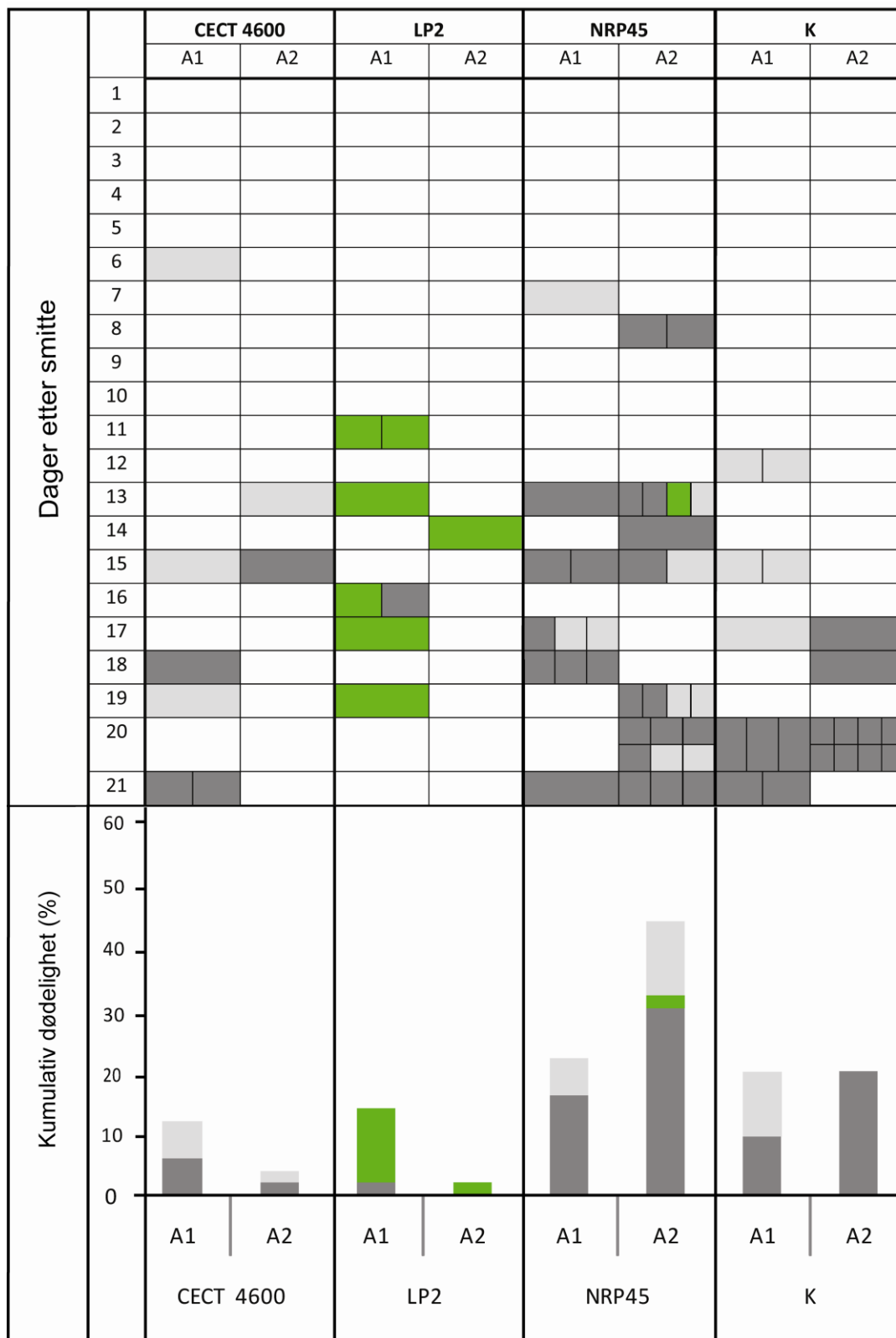
Dødelighet

I forsøk 3 var det totale antall individer benyttet i hvert kar henholdsvis 50 og 60 ved 12 °C og 15 °C, slik at hvert individ utgjorde henholdsvis 2 % og 1,7 % ved beregning av kumulativ dødelighet.

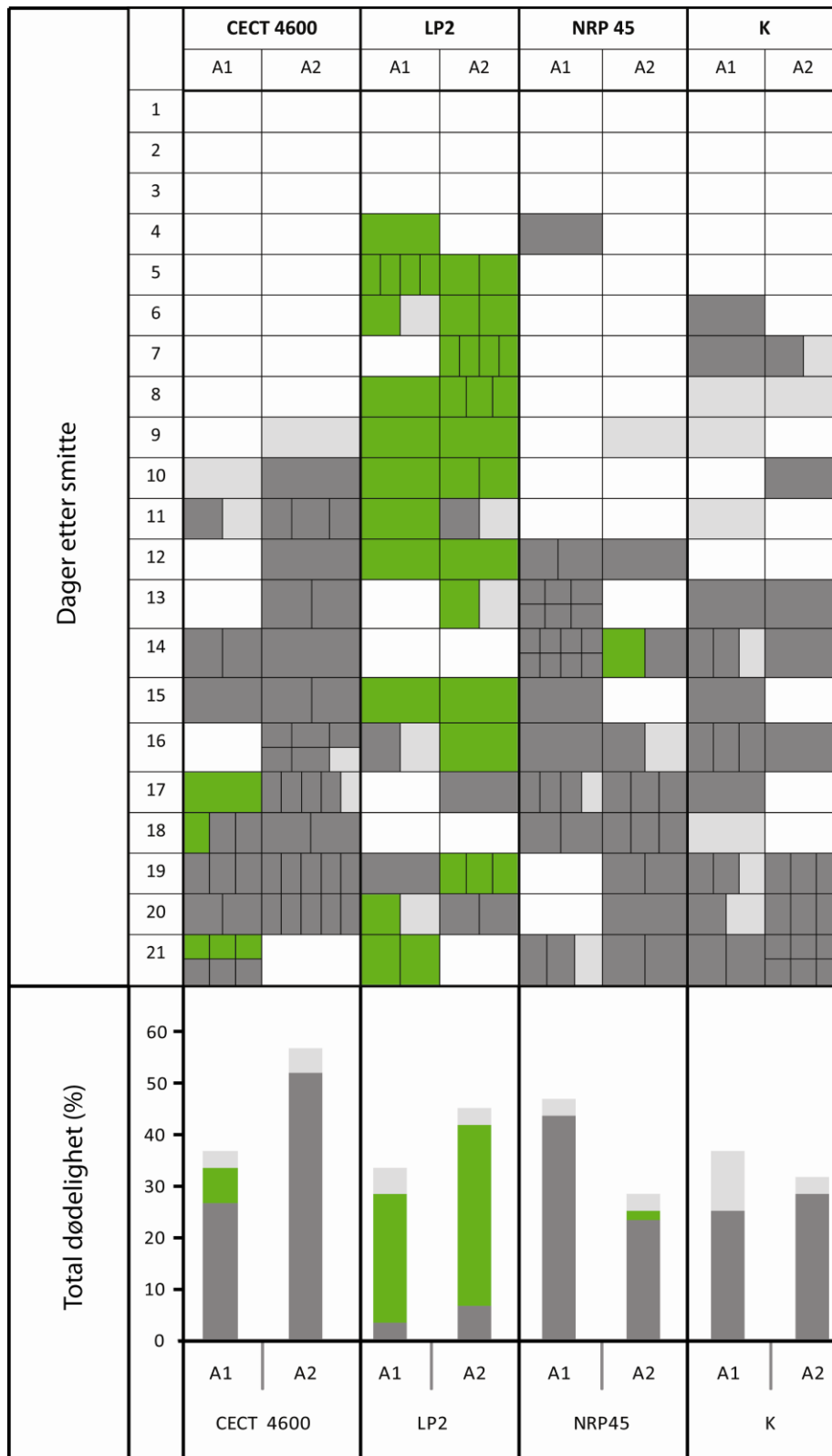
Dødeligheten i de forskjellige smittegruppene startet omtrent på samme tid ved 12 °C (se Figur 13 og 14). Ved 15 °C startet dødeligheten tidligst i de gruppene som var smittet med LP2 (med unntak av én enkeltfisk smittet med NRP45 i kar A1, som døde på dag fire etter smitte)(se Figur 15).



Figur 13. Kumulativ dødelighet i prosent hos fisk i forsøk 3 i karene som ble smittet med *Vibrio tapetis*-isolatene LP2 og CECT 4600 og NRP45, og i kontrollgruppene. Lilla og rød farge illustrerer henholdsvis forsøk ved 12 °C og 15 °C. Stiplete og prikkete linjer med samme farge illustrerer parallelle smittegrupper, der stiplede linjer viser dødelighet i karene A1, og prikkete linjer viser dødelighet i karene A2.



Figur 14. Forsøk 3, 12 °C. Dødelighet av grønnlyst smittet med *Vibrio tapetis*-isolatene CECT 4600, LP2 og NRP45. I tabellen øverst gir fargete felt en oversikt over tidspunkt for dødeligheten i smittegruppene gjennom hele forsøket. Hver fargete rute i tabellen representerer én fisk. Søylediagrammet nederst i figuren viser antall døde fisk i prosent. Grønn farge illustrerer reisolering av LP2. Mørk grå illustrerer dødelighet av *Vibrio* sp. Lys grå farge illustrerer død fisk hvor vi ikke fikk vekst av bakterier ved dyrking av nyreprøve.



Figur 15. Forsøk 3, 15 °C. Dødelighet av grønnlytt smittet med *Vibrio tapetis*-isolatene CECT 4600, LP2 og NRP45. I tabellen øverst gir fargete felt en oversikt over tidspunkt for dødeligheten i smittegruppene gjennom hele forsøket. Hver fargete rute i tabellen representerer en fisk. Søylediagrammet nederst i figuren viser antall døde fisk i prosent. Grønn farge illustrerer reisolering av LP2. Mørk grå illustrerer dødelighet av *Vibrio* sp. Lys grå farge illustrerer død fisk hvor vi ikke fikk vekst av bakterier ved dyrking av nyreprøve.

Ved sammenlikning av forsøkene ved 12 og 15 °C, ble det funnet at dødeligheten i smittegruppene startet tidligst ved høyeste temperatur, bortsett fra i gruppene som var smittet med NRP 45, hvor det ikke var forskjell i starttidspunkt for dødeligheten mellom de to temperaturene. I kontrollgruppene startet dødeligheten også tidligst ved høyeste temperatur (se Figur 13, 14 og 15). Det ble ved både 12 og 15 °C påvist dødelighet som var uavhengig av eksperimentell smitte. Dødeligheten i gruppene som var smittet med CECT 4600 og NRP 45 kunne ikke assosieres med gjenfunn. Det ble også registrert relativt høy dødelighet i kontrollgruppene, som faktisk var høyere enn i noen av smittegruppene (se Figur 14 og 15).

Isolering av bakterier fra forsøksfisk

16S rRNA gensekvensene til stammene LP2, CECT 4600 og NRP45 var svært like. GenBank sekvensen av LP2 inneholdt uavklarte posisjoner(N), og denne og de øvrige smittebakteriene ble derfor sekvensert. Det viste seg at posisjon 466 hos smittebakterien LP2 hadde tvetydig signal (R), med et dominerende G- og et svakere A - signal. CECT 4600 og NRP45 hadde rent G-signal i denne posisjonen (se Tabell 12 og Figur 16). I tillegg ble det funnet andre posisjoner med konsekvente tvetydige signaler, selv om en base dominerte. I posisjon 176 var de nysekvenserte smitteisolatene forskjellige; LP2 viste rent T - signal, CECT 4600 viste dominerende T- og lavt C - signal (T (Y)), mens NRP45 viste dominerende C- og lavt T - signal (C (Y)). De konsekvente tvetydige signalene ble registrert og posisjonene ble undersøkt nærmere i de reisolerte bakteriene. Oversikt over variable informative posisjoner hos de nysekvenserte smitteisolatene og hos utvalgte bakteriesterammer isolert fra fiskene er vist i tabell 12. Kromatogramutsnitt som viser variable posisjoner hos nukleotidsekvensene er vist i figur 16 på side 51.

I gruppene som ble smittet med NRP45, ble smittebakteriene ikke isolert fra noen av de døde fiskene. Fra forsøk 3 vokste det imidlertid opp to isolater fra fisk smittet ved 12 og 15 °C (ett isolat fra hver temperatur, henholdsvis isolat 16 og 77), som var positiv på *V. tapetis* - PCR og hadde identisk API - profil med LP2. Ved sekvensering av 16S rRNA - gen viste isolat 16 seg å være et *V. tapetis* - isolat identisk med smitteisolatet LP2 (se Tabell 12), mens isolat nr 77 var et *V. tapetis* - isolat identisk til isolatene 105, 117, 179, 185 og 186 (som ble isolert fra fisk som var smittet med CECT 4600, se neste avsnitt). Oversikt over sekvenserte isolater fra døde fisk smittet med NRP45 ved 12 °C, er vist i vedlegg B, tabell B6.

I gruppene som ble smittet med CECT 4600 ved 12 °C, ble smittebakteriene heller ikke isolert fra noen av de døde fiskene. Ved smitte med CECT 4600 ved 15 °C, ble det imidlertid fra ett kar

funnet fem isolater (isolat 105, 117, 179, 185 og 186)(se Vedlegg B, TabellB3), som ved sekvensering av 16S rRNA – gen, ble funnet å være *V. tapetis*. Disse isolatene viste ikke identisk signal på de tvetydige posisjonene til verken CECT 4600, NRP45 eller LP2, men alle isolatene fermenterte saccharose (gule kolonier på TCBS = LP2). Videre hadde tre av isolatene identisk API profil til LP2 (se tabell 12). To av isolatene (isolat nr 185 og 186) hadde identisk API-profil til LP2, men viste i tillegg positiv gelatintest og fermenterte melbiose (se vedlegg B, tabell B4). *V. tapetis* LP2 ble isolert fra de fleste fiskene som ble smittet med denne bakterien (henholdsvis 100 og 86 % av de døde fiskene ved 12 °C, og 75 og 78 % ved 15 °C)(fig. 14 og 15). Bakterien ble påvist i renkultur, med rikelig vekst, fra 36 av totalt 47 døde fisk, og med sparsom vekst fra tre fisk. Ved smitte ved 12 °C, hvor alle isolerte bakterier ble sekvensert (16S rRNA - genet), ble det med ett unntak funnet at alle isolatene var *V. tapetis* (> 99 % likhet med GenBank-sekvenser, se vedlegg B, tabell B8). Sekvensene var lik LP2 (isolat 18 og 42 vist i Tabell 12), API profilen var lik LP2 og bakteriene fermenterte saccharose (som LP2).

Ved sekvensering av isolater fra kontrollgruppene ved 12 °C, ble alle funnet å være *Vibrio* spp. Med unntak av ett isolat, viste disse høyest likhet med *V. splendidus* eller med arter nær beslektet med denne (se vedlegg B, tabell B7), Ett isolat ble identifisert som *Vibrio* sp. med høyest likhet med *V. ichthyoenteri* (99 %).

Fra fisk smittet ved 12 °C og 15 °C ble det til sammen isolert henholdsvis 23 og 13 isolater som var positive på PCR, men hadde negativ API - profil i forhold til bakterien fiskene var smittet med. Ved sekvensering ble det funnet at mange av isolatene viste høyest likhet med *V. splendidus* eller med arter nær beslektet med denne (se vedlegg B, tabell B7). Syv av isolatene ble identifisert som *Vibrio* sp. med høyest likhet med *V. ichthyoenteri*. API – profil og sekvenseringsresultater for disse isolatene kan ses i vedlegg B, tabell B1 – 4.

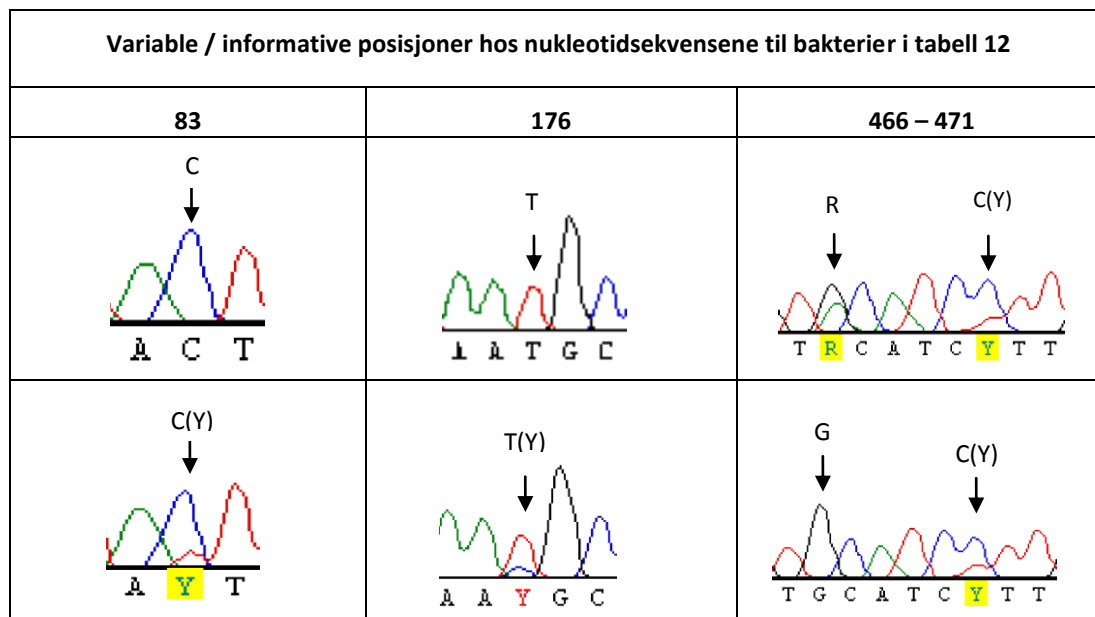
Ved dyrking fra fem av de overlevende fiskene i hver gruppe, ble det ved 12 °C ikke funnet oppvekst av bakterier. Ved 15 °C ble det ikke funnet vekst av bakterier fra fisk smittet med CECT 4600. I gruppene som ble smittet med NRP45 ble det fra tre fisk funnet vekst av *Vibrio* spp. I gruppene smittet med LP2, ble det funnet vekst av *Vibrio* spp. fra én fisk i hvert av karene. I kontrollgruppene ble det påvist *Vibrio* spp. fra to fisk og *V. tapetis* med høyest likhet til LP2 fra én av fiskene.

Tabell 12.

Oversikt over karaktertrekk hos smittebakteriene og utvalgte isolater fra smitteforsøkene. Isolat 105 - 186 er isolater fra fisk smittet med CECT 4600 fra forsøk 3, 15 °C. Isolat 9, 18 og 42, er isolater fra fisk smittet med LP2 i forsøk 3, 12 °C. Isolat 16 og 77 er fra fisk i forsøket som ble smittet med NRP45 ved hhv 12 og 15 °C. Alle bakterieisolatene var positive på *V. tapetis* - PCR. Tabellen viser variable / informative posisjoner hos nukleotidsekvensene til bakteriene, samt om API - profil er identisk med smitteisolatet. Informative posisjoner er uthøvet. Nysekvenserte smitteisolater er basert på fem sekvenseringer av hvert av isolatene CECT 4600, LP2 og NRP45.

* API – profil var identisk med profilen til LP2, men var i tillegg positiv på gelatin og melbiose.

Sekvens	83	176	466	471	Kolonifarge	API - profil identisk med:		
						LP2	CECT 4600	NRP45
LP2 AY129278 (fra database)	C	T	N	C	Gul	+	-	-
LP2 smitteisolat, nysekvensert ifm oppgaven	C (Y)	T	R	C (Y)	Gul	+	-	-
CECT 4600 Nr026361 (fra database)	C	T	G	C	Grønn	-	+	-
CECT 4600, nysekvensert ifm oppgaven	C	T (Y)	G	C (Y)	Grønn	-	+	-
NRP45 AM402968 (fra database)	C	C	G	C	Grønn	-	-	+
NRP45, nysekvensert ifm oppgaven	C	C (Y)	G	C	Grønn	-	-	+
Isolat 105, 15 °C smitte m/CECT 4600	C (Y)	T (Y)	G	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 117, 15 °C smitte m/CECT 4600	C (Y)	T (Y)	G	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 179, 15 °C smitte m/CECT 4600	C (Y)	T (Y)	G	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 185, 15 °C smitte m/CECT 4600	C (Y)	T (Y)	G	C (Y)	Gul	+ *	-	-
Isolat 186, 15 °C smitte m/CECT 4600	C (Y)	T (Y)	G	C	Gul	+ *	-	-
Isolat 9, 12 °C smitte m/LP2 <i>V. tapetis</i>	C (Y)	T	R	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 18, 12 °C smitte m/LP2 <i>V. tapetis</i>	C (Y)	T	R	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 42, 12 °C smitte m/LP2 <i>V. tapetis</i>	C (Y)	T	R	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 16, 12 °C smitte m/NRP45 <i>V. tapetis</i>	C (Y)	T	R	C (Y)	Gul	+	-	-
Isolat 77, 15 °C smitte m/NRP45 <i>V. tapetis</i>	C (Y)	T (Y)	G	C (Y)	Gul	+	-	-



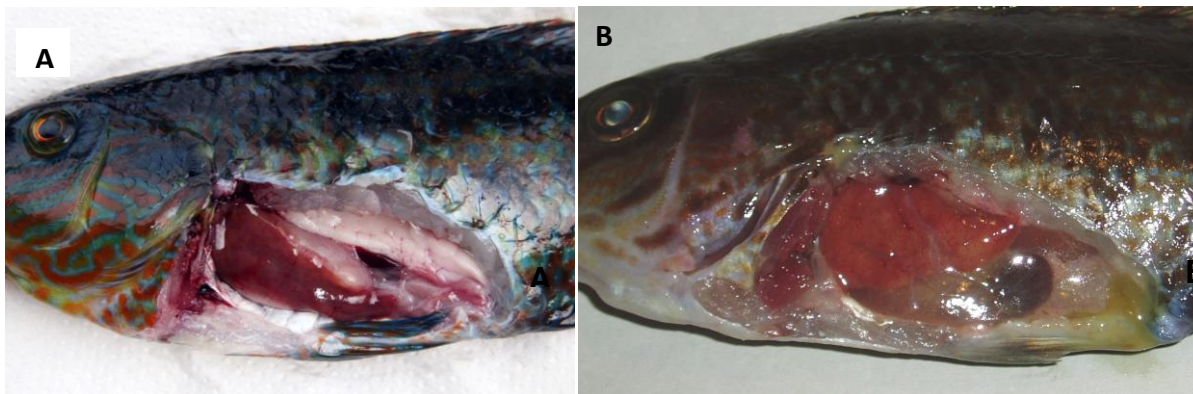
Figur 16. Utsnitt av kromatogrammer som viser variable / informative posisjoner (posisjon 83, 176 og 466 – 471)(piler) hos nukleotidsekvensene til bakterier vist i tabell 12.

Kliniske tegn / patologi

Fiskene hadde under hele forsøksperioden en nervøs atferd, og spiste lite. Flere fisk hadde en blek hudfarge. Av ytre kliniske endringer var overflatesår og blødninger i huden. En del fisk hadde snutesår og rødhet i hoderegionen, sår ved finnebasis og finnererosjon (se Figur 17). Noen få fisk hadde også bittsår i hale og buk. I forsøk 1 og 3 hadde mange hunnfisker rødt og oppsvulmet gatt, og flere av disse hadde også sår rundt gattet. Ved obduksjon av døde fisk var de viktigste patologiske funnene ascites (se Figur 18 B), væskefylt og dilatert tarm og svullen milt. Petecchier på viscera ble observert hos noen få fisk. Flere fisk hadde autolyisert viscera knyttet til *post mortem* forandringer.

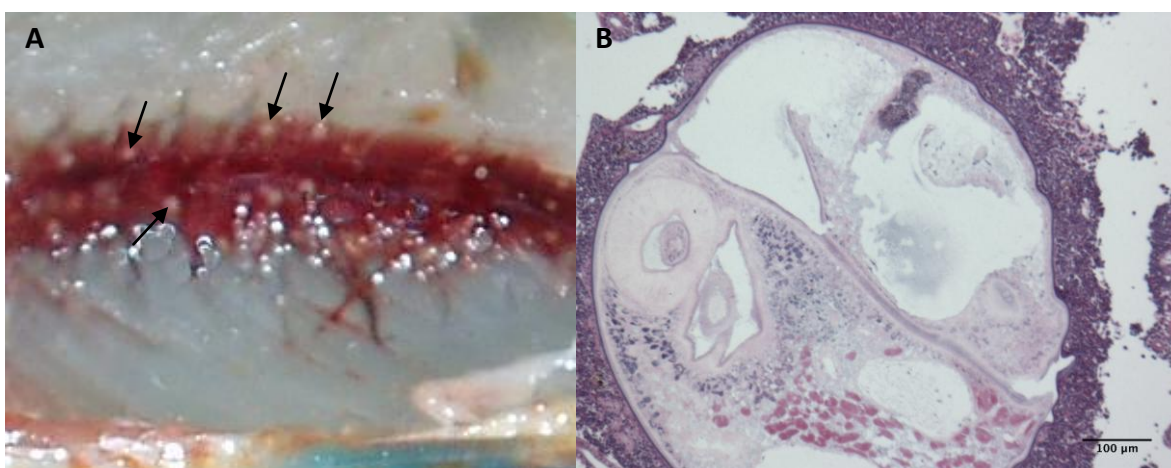


Figur 17. Grønnngylt med hudsår, slitt halefinne og sår ved finnebasis (piler).



Figur 18 A: Viscera hos en frisk grønngylt uten ascitesvæske. **B:** Grønngylt med ascitesvæske i bukhulen. På bildet er peritoneum intakt. Ved punktering av peritoneum rant ascitesvæske ut.

Det ble registrert få "svimere". Vi kunne ikke se bakterier fra nyre ved histologiske snitt av disse fiskene. I forsøk 3 ble det imidlertid observert fisk med hvite kuler i nyren (figur 19 A). Histologiske undersøkelser viste at kulene inneholdt trematode metacercarie – cyster (figur 19 B).



Figur 19 A: Utsnitt av nyre med hvite kuler (piler). **B:** Trematodecyste som ble funnet ved histologisk snitt av en kul (HES farge).

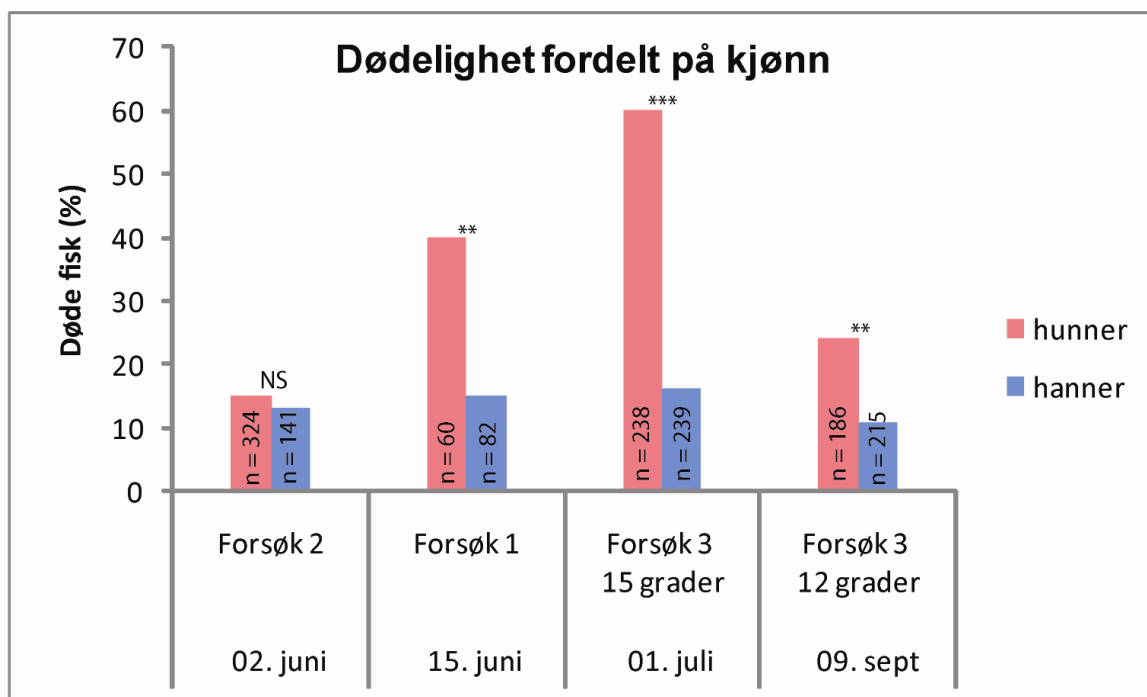
Det var ikke mulig å skille mellom døde kontrollfisk og døde fisk i smittegruppene med hensyn på kliniske tegn eller patologi. En oversikt over patologi hos døde fisk i forsøket er vist i vedlegg C tabell C1- 4.

Fra overlevende fisk i alle gruppene ble det observert fisk med hudsår. Ved obduksjon av fem overlevende fisk i hver gruppe ble det i forsøk 2 og 3 sett indre patologiske endringer som svullen milt, ascites og rød, dilatert, væsekfylt tarm.

Lengde, vekt og kjønnsfordeling av forsøksfisk

Data fra vektmålinger av døde og overlevende fisk fra forsøkene, tyder på at det ikke var noen sammenheng mellom dødelighet og størrelse på fiskene. I forsøk 1, 2 og 3 ved 15 °C, var vekt og størrelse identisk eller litt høyere hos døde fisk i forhold til overlevende, mens i forsøk 3 ved 12 °C var de overlevende fiskene en del større enn de døde (se Vedlegg D, tabell D4 – D7 og Vedlegg).

Kjønnsfordelingen av grønnngylt i de forskjellige forsøkene varierte. Det prosentvise forholdet mellom totalt antall hanner og hunner i forsøk 1, var henholdsvis 58:42. I forsøk 2, var forholdet mellom hunner og hanner 65:35, og i forsøk 3 var forholdet 56:44 ved 12 °C og 50:50 ved 15 °C. I forsøk 1 og forsøk 3, ved 12 og 15 °C, var det signifikante forskjeller i dødeligheten mellom hunner og hanner. I forsøk 2 var forskjellen i dødeligheten mellom hunner og hanner ikke signifikant. Det prosentvise forholdet mellom døde hunner og hanner er vist i figur 20 og i vedlegg D, tabell D4 – 7.



Figur 20. Døde hunner og hanner i prosent av totalt antall hunner og hanner (n) i hvert forsøk. Dødeligheten er her beregnet ut fra badsmittforsøkene, til og med dag 21 etter smitte. Stolpediagrammet viser hvordan dødeligheten øker hos hunnene i forbindelse med gytetiden. Ikke signifikant (NS), $p < 0,01$ (**) og $p < 0,001$ (***).

Det ble observert 17 sekundærhanner blant de totalt ca 685 grønnngylthannene som ble benyttet i forsøkene. Dette tilsvarer en andel sekundærhanner på ca 2,5 %. Kjønn, lengde og vekt hos alle forsøksfiskene er vist i vedlegg D, tabell D9 - 15.

DISKUSJON

Grønnfylt i fangenskap

Erfaringer med oppbevaring av grønnfylt i kar, viser at fisken har en nervøs atferd og en rask stressrespons på endringer i lysforhold, bevegelser og vibrasjoner i karene. For å etterligne fiskens naturlige levested, hvor den benytter skjul i tangvegetasjon og steinrøyser og utnytter de mulighetene biotopen gir for skjul og skygge ([Hilldén 1984](#); [Mortensen S/ Karlsbakk E, pers. medd.](#)), gikk forsøksfiskene derfor i kar med lav lysstyrke og skjulesteder bestående av stabler med PVC-rør. Grønnfyltene var allikevel synlig stresset under hele forsøksperioden, noe som tyder på at det er vanskelig å optimalisere forholdene slik at grønnfylten finner seg til rette i karmiljøet.

Bruk av villfanget forsøksfisk

Det finnes ikke oppdrettet grønnfylt. Grønnfylten som ble brukt i våre forsøk var derfor villfanget. Forskjell i vekt og størrelse hos forsøksfiskene var derfor variabel, og i henhold til [Alvsvåg \(1993\)](#) representerer lengdeforskjellene av fisk i hvert forsøk en variasjon i fiskealder fra 2 til 5-6 år.

Hos villfanget leppefisk er det oftest i lagringsfasen - de første ukene etter fangst - at småskader fra fangst og håndtering gir seg utslag i sårdannelse og økt dødelighet. Fiskene til forsøkene ble derfor håndtert så skånsomt som mulig under fangst og transport, for å redusere sårskader og stress. Fisk med synlige skader ble ikke tatt med i forsøkene.

For å undersøke fiskens helsestatus før forsøkene, ville det vært hensiktsmessig å observere fiskene i en karenperiode. Dette gjøres vanligvis for å undersøke om fiskene bærer med seg eventuelle latente sykdommer/opportunistiske bakterier som kan bli "trigget" under transport og håndtering, og dermed gi utslag i sykdom. En slik undersøkelse er særlig aktuell ved arbeid med villfisk, der sykdomshistorien er ukjent. I forsøk 2 og 3 (ved 12 og 15 °C), ble det registrert en jevn dødelighet i kontrollgruppene helt frem til forsøksslutt, etter henholdsvis 26 og 21 dager. Dette gir indikasjoner på at en eventuell karenstid for grønnfylt bør være på minimum tre uker. Dødeligheten i kontrollgruppene var videre svært høy, og i forsøk 2 ved 12 °C var dødeligheten etter 25 dager på hele 47,5 %. Med en slik høy "bakgrunnsdødelighet" vil det være ressurskrevende og svært uforutsigbart å oppbevare grønnfylt i en karenperiode, da det er uvisst hvor mange overlevende fisk som vil være igjen til et eventuelt forsøk.

Erfaringer fra flere forsøk med grønngylt ved Havforskningsinstituttet viser at denne fisken får vibrioser etter oppbevaring i kar over tid (Samuelsen m. fl. 2003; Jensen m. fl. 2003; Bergh og Samuelsen 2007). Forsøksfiskene til Bergh og Samuelsen (2007) hadde vært oppbevart i kar i 14 dager før forsøksstart, og de opplevde en jevn dødelighet i denne perioden (Rudra H / Bergh Ø pers. medd.). De registrerte videre forholdsvis høy dødelighet i kontrollgruppene (33 %), og et tidlig dødelighetsforløp, som førte til at forsøket ble avsluttet allerede ved dag 12 etter smitte. For å ha en mulighet til å gjennomføre våre forsøk, ble karenperiode derfor frarådet, og det ble anbefalt å overføre forsøksfiskene fra transporttank, direkte over i forsøkskar, og smittebelaste fiskene dagen etter ankomst til Havforskningsinstituttet (Bergh Ø, pers. medd.). Fiskene vil derfor kunne ha bærerstatus av ulike patogener som må vurderes i analysen av resultatene (se side 61).

Avliving av forsøksfisk

Metoder for avliving og prøvetaking av forsøksfisk er i hovedsak utviklet for laksefisk og etter hvert tilpasset andre oppdrettsarter. Vanlig prosedyre ved avliving, er å bade fisken i en overdose av bedøvingsmidlet benzokain, eller å benytte slag mot hodet. Disse metodene fungerte imidlertid ikke optimalt på grønngylt. Slag mot hodet er vanskelig på så liten fisk, og ble vurdert som usikkert. Ved bruk av benzokain, ble det ved obduksjon av fisk observert blødninger i viscera (se Materiale og metoder, side 23). Blødningene ble observert umiddelbart etter behandling i benzocainbad. Årsaken til dette er ukjent, og vi har ikke funnet litteratur som beskriver dette problemet. Avliving ved hjelp av syl i hjernen fungerte bra.

Metoder benyttet til identifikasjon av bakterier fra død fisk

I forsøk 1 og 2 ble det etter en innledende dyrking fra hodenyre på Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS), og en videre seleksjon av bakterier som vokste ved 18 °C, men ikke ved 30 °C, benyttet API 20E til identifikasjon av bakterier. API 20E - metoden er vanlig å benytte i diagnostikk av fiskepatogene bakterier (Austin og Austin 2007) og kan benyttes til sammenligning av bakterier, under forutsetning av at testene settes opp med identiske tids- og temperaturbetingelser. Grisez m. fl (1991) mente at selv om metoden ga en del falske positive og negative resultater, var API 20E godt egnet til identifikasjon av fiskepatogene *Vibrio* - bakterier. Etter som det ble generert resultater fra forsøkene, erfarte vi imidlertid at API 20E - metoden ga noen usikre resultater, og ikke var pålitelig som eneste identifikasjonsmetode. Dette problemet er også påpekt tidligere (Santos m. fl. 1993; Topic Popovic 2007).

Usikkerheten i API 20E-metoden ble registrert i forbindelse med forsøk 2 og 3. I forsøk 2 ble det satt opp nye API 20E-tester på enkelte bakterieisolater som hadde positiv gelatintest, men ellers identisk API 20E – mønster til smittebakterien *V. tapetis* LP2. Ved nytt oppsett, viste det seg at gelatintesten kunne variere, selv ved identisk inkubasjonstid og -temperatur. For å kunne definere om isolerte bakterier var identiske med smittebakteriene, ble det derfor valgt å benytte API 20-E i kombinasjon med *Vibrio tapetis* - spesifikk PCR (Paillard m. fl. 2006) som diagnostisk verktøy i forsøk 3. I forsøk 3 ved 15 °C, viste usikkerheten i API 20E - testen seg hos isolat nr 185 og 186. Isolatene hadde API 20E - profil som ikke var forenlig med *V. tapetis* LP2 (de testet positivt på gelatinase og fermenterte melbiose, se Tabell 10 og Vedlegg B, Tabell B4). Isolatene ble senere sekvensert, og likevel funnet å være *Vibrio tapetis* med 99 % likhet til *V. tapetis* LP2. Videre hadde isolat nr 121 og 142 identisk API 20E - profil til *V. tapetis* LP2, men viste seg ved sekvensering å være andre *Vibrio* – arter med høyest likhet til *V. splendidus* (se Vedlegg B, tabell B3 og B4).

Det viste seg imidlertid også å være en del usikkerhet knyttet til *Vibrio tapetis* PCR - metoden. Usikkerheten kom tydelig frem i forsøk 3 ved 12 °C og 15 °C, hvor det ble funnet henholdsvis 23 og 13 isolater som testet positivt på *Vibrio tapetis* PCR, men hadde API-profil som ikke var identisk med bakterieisolatet som fiskene var smittet med. Ved sekvensering av isolatene viste det seg at 30 av isolatene var andre *Vibrio* spp enn *V. tapetis* (se Vedlegg B, tabell B1 – B4). Våre resultater viser derfor at PCR-testen til Paillard m. fl. (2006) kan gi falske positive resultater.

Bakterieisolater benyttet til smitte

Etter at smitteforsøkene var gjennomført, ble det funnet at NRP45, som var antatt å være et *V. tapetis* isolat, likevel ikke var *V. tapetis*. Ved DNA:DNA hybridisering utført av Paillard m. fl. (2008), hadde dette isolatet kun 55 % likhet til typestammen CECT 4600. NRP45 oppfyller derfor ikke kravet til minst 70 % likhet med typeisolatet (Wayne m. fl. 1987), og er ikke et *V. tapetis* - isolat. NRP45 blir imidlertid kalt *V. tapetis* - liknende av Paillard m. fl. (2008), da fylogenetiske analyser klusterer isolatet med *V. tapetis* (Paillard m. fl. 2008).

Sammenlikning av bad- og intraperitoneal smitte

Forsøk 1 ble utført for å sammenlikne bad – og intraperitoneal (ip) smitte. Badsmitte har tidligere vært benyttet i smitteforsøk med *Vibrio tapetis* på grønngylt (Bergh og Samuelsen 2007). Bad er regnet for å være den mest naturlige smitemåten, men er imidlertid forbundet

med noe usikkerhet. Grønnngylt pådrar seg ofte sår og skader under innfangning og transport. Hos skadet fisk kan bakteriene finne andre smitteveier inn i fisken enn hos resten av forsøksfiskene, noe som kan resultere i varierende smitte- og sykdomsforløp. Smitte ved ip - injeksjon er mindre naturlig, men gir mulighet for større kontroll over mengden bakterier som hver enkelt fisk blir smittet med.

Ved smitte med ip - injeksjon, var dødeligheten lavest (20 %) ved den laveste smittedosen, mens det ikke var forskjell i dødeligheten mellom medium og høy smittedose (dødeligheten var 35 % i begge gruppene)(Figur 9 og 10). Bakterier med API - profil identisk med LP2 (heretter "LP2") ble isolert fra alle fiskene som fikk medium smittedose, og det er derfor sannsynlig at det var smittebakterien som ble reisolert. Fra fiskene som hadde fått høy smittedose, ble LP2 kun isolert fra én av de syv døde fiskene. Hos de seks øvrige døde fiskene som fikk høy dose, ble det isolert andre *Vibrio* spp. (tre fisk) eller ikke påvist bakterier (tre fisk)(Figur 10). Dødeligheten ved høy dose stikk startet ni dager senere enn ved medium dose stikk. Grunnen til den sene dødeligheten og den lave prosentandelen med *V. tapetis* LP2 - liknende bakterier isolert fra fisk i karet som fikk høyeste injeksjonsdose, er uvisst. På bakgrunn av de motstridende resultatene ved ip - smitte, ble badsmitte derfor vurdert som mest pålitelig smittemetode, og badsmitte tilsvarende høyeste smittedose, ble benyttet i de videre forsøkene.

Temperatures innvirkning på dødeligheten av grønnngylt

Med bakgrunn i høy dødelighet av grønnngylt som registreres i merdene både sommer- og vinterstid, ble det utført smitteforsøk ved forskjellige temperaturer, fra vinter- til sommertemperatur. Nedre temperaturgrense ble satt til 6 °C, for å ligge noe over 5 °C, som er regnet for å være nedre aktivitetstemperatur for grønnngylt (Kvenseth 2003). Øvre temperaturgrense ble satt til 15 °C, som er en realistisk sommertemperatur i innfangingsområdet. Med 6 °C og 15 °C som ytterpunkter var det i tillegg naturlig å velge 9 °C og 12 °C.

Forsøksresultatene viser en trend til økt dødelighet i smittegruppene ved stigende temperatur både i forsøk 2 og 3. Dette kan ha sin årsak i at bakteriene sannsynligvis har hatt de beste betingelsene ved de høyeste temperaturene. Det er fra før kjent at vibrioseutbrudd på grunn av *Vibrio anguillarum* hyppigst er registrert i sommermånedene og er assosiert med sjøvannstemperaturer over 15 °C (Austin og Austin 2007). Videre er det fra andre forsøk funnet at temperatur og dyrkingsbetingelser for bakterier, har innvirkning på en bakteries virulens

(Decostere m. fl. 1999; Colquhoun og Sørnum 2001). I forsøk 2 ble LP2 isolert fra signifikant flere fisk ved 15 °C enn ved 6 °C. Den lave dødeligheten i forsøk 2 ved 6 °C (henholdsvis 0 % og 5 % i smittegruppene og 5 % i kontrollgruppen), og den dermed lave påvisningen av LP2 fra fisk ved denne temperaruen, kan derfor også kanskje forklares med suboptimal smittetemperatur for bakterien. Den lave dødeligheten ved 6 °C var imidlertid uventet, i henhold til antakelsene om at grønnngylten har lav toleranse for lave temperaturer (Hilldén 1984), og videre oppdretternes rapporteringer om store tap av leppefisk om vinteren. Vi vet imidlertid ikke om den lave temperaturen kan ha gitt et forsinket sykdomsforløp som dermed ikke ble registrert i løpet av forsøksperioden.

Dersom vi sammenligner dødeligheten til fisk som ble badsmittet med LP2 i forsøk 1, 2 og 3 ved 12 °C, ser vi at dødeligheten ved denne temperaturen er svært variabel. Etter 21 dager var dødeligheten 35 % i forsøk 1, henholdsvis 37,5 og 20 % i forsøk 2, og 2 og 14 % i forsøk 3. Ved samme temperatur varierte altså dødeligheten fra 2 % til 37,5 %. Da fisketettheten i karene var forskjellige i disse forsøkene (med antall liter sjøvann per fisk på henholdsvis 8, 5 i forsøk 1, 5 i forsøk 2 og 4 i forsøk 3 ved 12 °C), kunne det forventes at det i kar med høyest fisketetthet ville oppleves høyest smittepress, og dermed økt dødelighet. Dødeligheten var imidlertid lavest i karene der fisketettheten var høyest (forsøk 3 ved 12 °C), slik at forskjell i fisketetthet ikke ser ut til å ha påvirket dødeligheten i disse forsøkene.

Den høyeste registrerte dødeligheten (37,5 %) i våre forsøk var betydelig lavere enn det Bergh og Samuelsen (2007) rapporterte i sitt forsøk, hvor det ble registrert 62 og 90 % dødelighet ved 12 °C allerede etter 12 dager. (Temperaturen i forsøket til Bergh og Samuelsen (2007) var feilaktig oppgitt til å være 9 °C. Korrekt temperatur var imidlertid 12 °C (Samuelsen OB, pers. medd.)). Variasjon i dødelighet ved samme temperatur og smittebakterie innen våre egne forsøk og sammenlignet med forsøkene til Bergh og Samuelsen (2007), tyder på at reproduserbarheten i smitteforsøk med villfanget grønnngylt er lav.

Dødelighet forbundet med kjønn og fangsttidspunkt

Fisk til forsøkene ble hentet inn i tidsrommet fra 2. juni til 10. september. I forsøk 1 og 3 (både ved 12 og 15 °C) registrerte vi signifikant høyere dødelighet hos hunner enn hos hanner. De største forskjellene i dødelighet mellom hunner og hanner ble registrert i forsøk 1 og forsøk 3 ved 15 °C, hvor prosentandelen av døde hunner og hanner var henholdsvis 35:15 og 61:16. Fiskene i disse forsøkene ble innfanget i midten av juni og begynnelsen av juli, i tiden under og

like i etterkant av gyteperioden, og det ble hos en stor andel av hunnene funnet rødt og oppsvulmet gatt. Noen av disse fiskene hadde også sår rundt gattet, som kan ha representert en mulig introduksjonsvei for bakterier. Videre er det mulig at stress i en periode med revirhevding og gyting kan ha virket inn på fiskenes motstandskraft, eller at fiskene påfører hverandre skader i gyteperioden. I forsøk 3 ved 12 °C - som ble utført i september - ble det også registrert hunner med sårt gatt (se Vedlegg C, Tabell C3). Dette kan tyde på at det også var gyteaktivitet i denne perioden. I forsøk 2, hvor forskjellen i dødelighet mellom kjønnene ikke var signifikant forskjellige, ble fisken hentet inn tidlig på sommeren (1. juni). Disse fiskene hadde ikke innslag av rødt og oppsvulmet gatt, og ved obduksjon av døde fisk ble det heller ikke registrert gyteklare fisk. Dette kan også underbygge at forhold knyttet til kjønnsmodning og gyting påvirker dødeligheten av hunnfisk.

Den økte dødeligheten av hunnfisk i tiden rundt gyteperioden, kan ha virket inn på forsøks - resultatene. Den høye dødeligheten som ble observert i forsøk 3 ved 15 °C i forhold til 12 °C, kan derfor ikke med sikkerhet tilskrives høyere temperatur, men kan være relatert til kjønn. Dette underbygges av at andelen døde hanner ikke er signifikant høyere ved 15 °C enn ved 12 °C. Imidlertid synes den økte dødeligheten ved stigende temperatur i forsøk 2 ikke å være kjønns - relatert, da det i dette forsøket ikke er forskjell i dødeligheten hos hunner og hanner. På grunnlag av den økte dødelighet hos hunner rundt gyteperioden, kan det se ut som at fangst av grønnngylt bør unngås i denne tiden.

Kliniske tegn / patologi

Kliniske tegn og patologiske endringer hos forsøksfiskene tilsvarte dem som er beskrevet for klassisk vibriose ([Larsen og Pedersen 1999](#); [Austin og Austin 2007](#)). Fiskene hadde dårlig matlyst, og de mest fremtredende kliniske tegnene var blødninger ved halerot, snute og finnebasis og store hudsår. En del fisk hadde blek hudfarge. Utstående øyne (eksoftalmi) ble imidlertid ikke observert. Av indre patologiske endringer ble det hyppigst observert væskefylt, utspilt tarm, petecchier på viscera, ascitesvæske og svullen milt. Hos mange av de overlevende fiskene ble det imidlertid ikke observert kliniske tegn eller patologiske forandringer. Dette tyder på at det var individuell variasjon med hensyn på mottakelighet for *Vibrio*-bakterier hos fiskene. Dette kan skyldes at fisk med ytre skader - som hudsår - kan ha vært ekstra mottakelige for infeksjon ved badsmitte. Fisk som i utgangspunktet var bærere av bakterier, eller var syke ved fangst (for eksempel infeksjoner med tremtode metacercarier i nyren), kan også ha vært svekket og ekstra mottakelige for infeksjoner. Disse funnene kan derfor tyde på at *Vibrio tapetis*

LP2 ikke er en primærpatogen bakterie, men en opportunistisk patogen bakterie som gir sykdom når grønnngylten er svekket.

Hos en del overlevende fisk i alle forsøkene, ble det observert kliniske tegn som sår, og i forsøk 2 og 3 (ved begge temperaturer) ble det observert patologiske forandringer hos flere fisk som ble obdusert. Dette tyder på at dødeligheten sannsynligvis ville fortsatt dersom forsøksstiden hadde hatt en lengre varighet.

Funn av bakterier fra smitteforsøkene

Det er sannsynlig at *V. tapetis* LP2 ble reisolert fra fisk som ble smittet med denne bakterien. Fra forsøk 3 ved 12 °C, ble alle isolatene fra fisk som ble smittet med *V. tapetis* LP2, funnet å være positive på *V. tapetis* - PCR, og fra henholdsvis 12 og 15 °C ble bakterier med >99 % likhet til *V. tapetis* LP2 (basert på sekvensering med 16S rRNA - gen), isolert fra 87,5 % og 77 % av de døde fiskene. Isolatene hadde også identisk API 20E – profil til *V. tapetis* LP2. Videre startet dødeligheten etter smitte med *V. tapetis* LP2 ved 15 °C tidligere i forhold til de andre smitte - gruppene, noe som underbygger antakelsen om at bakterien kan være patogen for grønnngylt. Fra forsøk 1 og 2 ble det isolert bakterier som vokste i renkultur med rikelig vekst fra de fleste fiskene som døde i forsøkene. Bakteriene vokste med gule kolonier på TCBS - agar og hadde identisk API 20E- profil til *V. tapetis* LP2. Basert på disse funnene og resultatene fra forsøk 3, er det derfor sannsynlig at fisk i forsøk 1 og 2 var smittet med *V. tapetis* LP2, selv om bakterien i disse forsøkene ikke var verifisert med PCR eller sekvensering.

Skjellisolatene NRP 45 eller CECT 4600 ble *ikke* isolert fra fisk som var smittet med disse bakteriene. Våre funn tyder altså på at verken CECT 4600 eller NRP45 er patogener for grønnngylt. I forsøk utført av [C. Paillard \(2008\)](#) ved Universitetet i Brest, Frankrike, ble de samme isolatene (LP2, NRP45 og CECT 4600) benyttet i smitteforsøk med teppeskjellyngel. Resultatene fra disse forsøkene viste at kun skjell smittet med CECT 4600 fikk økt prevalens med BRD symptomer. Dette bekrefter tidligere resultater som tyder på at CECT 4600 er en spesifikk patogen for teppeskjell ([Paillard m. fl. 1990](#)), og indikerer videre at verken LP2 eller NRP45 er primære patogener for teppeskjell. Risiko for kryssmitte med disse *Vibrio*-isolatene mellom skjell og fisk vurderes derfor som lav.

Selv om smittebakteriene CECT 4600 og NRP45 ikke ble isolert fra døde fisk, ble det registrert relativt høy dødelighet, særlig i forsøket ved 15 °C, og det ble isolert bakterier fra døde fisk i alle gruppene (også kontrollgruppene) som ofte var assosiert med bakterieinfeksjoner.

Funn av *V. tapetis* - liknende bakterier som var forskjellige fra smittebakteriene (se figur 14 og 15 og tabell 12), tyder på at dette er bakterier som forekommer naturlig i grønnngyltbestander. I tillegg til *V. tapetis* er det sannsynlig at særlig stammer av *Vibrio splendidus* representerer et problem. Det ble i forsøk 3, både i smittegruppene ved begge temperaturer, og i kontroll - gruppene ved 12 °C, funnet rikelig oppvekst av *V. splendidus* i renkultur fra flere fisk som hadde kliniske tegn forenlig med vibriose. Flere av isolatene hadde høy sekvenslikhet med *V. splendidus* LP1 (se Vedlegg B, Tabell B1, B3 og B6). Dette bekrefter funnene til [Jensen m. fl \(2003\)](#) og funn fra grønnngylt innsamlet fra laksemerder ([Einen ACB, pers. medd.](#)), og viser at disse bakteriene sannsynligvis kan være patogene for grønnngylt.

Funn av andre *Vibrio* spp. enn smittebakteriene, både hos kontrollfisk og fra fisk i smitte - gruppene, bekrefter at grønnngylt er mottakelig for *Vibrio*-infeksjoner. Funnene tyder også på at disse bakteriene var til stede i subpopulasjonene som ble samlet inn. Det ble imidlertid ikke påvist bakterier i kontrollprøver som ble tatt av fisk før forsøkene (totalt 80 fisk). Dette tyder på at fiskene ikke var klinisk syke ved fangst, men i varierende grad utviklet sykdom etter innfangning. Da fisken var stresset i alle forsøksoppsettene, kan dette i kombinasjon med mulige skader og økt smittepress i karene ha ført til sykdom. Fæces fra bærerindivider kan ha vært en betydelig smittekilde i karene. Det kan også tenkes at smitte med én bakterieart (for eksempel *V. tapetis* LP2) kan ha ført til fremvekst av andre bakterier som fiskene bar med seg. En mulig bærertilstand kan også være en forklaring på den høye dødeligheten i kontrollgruppene, og at det i forsøk 1 - etter injisering av høyeste dose LP2 ("boosting") - ble isolert andre *Vibrio* spp. enn *V. tapetis* LP2 fra flere av de døde fiskene. En slik "boosting" effekt kan også forklare at vi ved smitte med CECT 4600 og NRP45 isolerte andre *Vibrio* spp.

Konklusjoner

1. Grønnngyltisolatet *Vibrio tapetis* LP2, kan være patogent for grønnngylt. Skjellisolatene *Vibrio tapetis* CECT 4600 og det *Vibrio tapetis* - liknende isolatet NRP45 ser ikke ut til å gi sykdom hos grønnngylt. En mulig kryssmitte med NRP45 mellom skjell og grønnngylt kan derfor vurderes som lite sannsynlig.
2. Temperaturen har innvirkning på dødeligheten hos grønnngylt ved smitte med *Vibrio tapetis* LP2. Det ble funnet en signifikant høyere dødelighet ved 15 °C enn ved 6 °C, og det ble isolert *Vibrio tapetis* LP2 fra signifikant flere fisk ved 15 °C enn ved 6 °C.

Anbefalinger og forslag til videre arbeid

Arbeidet som er beskrevet i denne oppgaven kan legge grunnlaget for et videre arbeid med bakterielle infeksjoner hos leppefisk:

- Det er avdekket svakheter i *Vibrio tapetis* -PCR - metoden til [Paillard m. fl. \(2006\)](#). Det bør derfor arbeides med en videre optimalisering av denne metoden.
- Indre blødninger hos grønnngylt som følge av bedøvelsesmidlet benzocain, er ikke tidligere rapportert. Bivirkningen av bezocain bør studeres nærmere hos flere leppefiskarter, spesielt hos berggylt i oppdrett, hvor bruk av dette bedøvelsesmidlet kan være aktuelt.
- For å eliminere effekten av flere ulike bakterier i forsøkene, kan fremtidige forsøk gjøres med grønnngylt som i forkant av forsøkene er medisineret for vibrioser som beskrevet av [Samuelsen m. fl. \(2000 og 2003\)](#).
- Det ville være interessant å bestemme nærmere det *Vibrio ichthyenteri* - liknende isolatet som ble isolert fra flere grønnngylt i forsøkene. Dette er en bakterieart som tidligere kun er påvist hos larver av Japansk flyndre, *Paralichthys olivaceus*, i japanske og koreanske klekkerier, der den er forbundet med tarmnekrose og høy dødelighet ([Ishimaru m. fl. 1996](#), [Kim m. fl 2004](#)). Dersom isolatene viser seg å være *V. ichthyenteri*, er dette første funn fra andre arter enn japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*). I et videre arbeid ville det være relevant å gjennomføre nye smittestudier med dette isolatet fra grønnngylt.

Arbeidet har også avdekket flere problemstillinger som kan være viktige for å oppnå et bærekraftig fiske og en etisk forsvarlig bruk av leppefisk i oppdrett av laksefisk:

- Det ble hos fisk som var innfanget rundt gytetidspunkt, registrert en betydelig høyere dødelighet hos hunner enn hos hanner. Mange hunnfisk hadde sår rundt gattet, og så ut til å være spesielt mottakelige for bakterieinfeksjoner i gyteperioden. Fangst av grønnngylt bør derfor unngås i denne perioden.

- Observasjoner av innfanget fisk tydet på at enkelte fisk var gyteklare på andre tidspunkt enn den antatte gyteperioden midt på sommeren. Det er derfor viktig å få mer kunnskap om gyteperiodene hos grønnngylt langs kysten, slik at man bedre kan finne optimal fangstperiode.
- Med dagens omfattende fangsting og bruk av vill leppefisk er det behov for å videreføre arbeidet med å beskrive patogene bakterier hos både grønnngylt og andre leppefiskarter. Det skjer en storstilt flytting av leppefisk fra fangstområder ved Oslofjorden og langs kysten av Sørlandet, til oppdrettsområdene på Vestlandet og langs kysten av Midt-Norge. Mikrosatelitt DNA undersøkelser som er utført på grønnngylt, tyder på at grønnngylt som lever i norske farvann sannsynligvis består av små lokale bestander med svært liten horisontal vandring ([Knutsen H, m. fl. in prep.](#)). Hvis dette er tilfelle, er det også mulig at forekomsten av patogener varierer mellom ulike områder, og det er en mulighet for at flytting av fisk kan resultere i en uønsket smittespredning. Det er derfor behov for en utvidet sykdoms - overvåking for å klargjøre utbredelsen av patogene bakterier i bestander av leppefisk langs kysten.

REFERANSER

Alvsvåg J (1993) Fødeval, vekst og energiallokering hos grasgylt (*Centrolaburus exoletus* L) og grønngylt (*Symphodus melops* L) (Pisces: Labridae) på vestkysten av Noreg, og diettoverlapping med 0-gruppe torsk (*Gadus morhua* L) – Hovedfagsoppgave. Universitetet i Bergen. 70 s.

Andersen P, Wiik T, Maroni K (1993) Rapport fra leppefiskprosjektet i Nord-Trøndelag sommeren / høsten 1992. Akva Instituttet AS. 16 s.

Armada SP, Farto R, Perez MJ, Nieto TP (2003) Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype 1. *Microbiology* 149:369 - 375.

Austin B, Austin D (2007) Characteristics of pathogens: Gram-negative bacteria. s. 81-150. I: Austin B, Austin D (red). *Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish.* Springer and Praxis publishing, Chichester, UK.

Austin B, Austin D (1999) *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, 3rd ed. Springer – Verlag KG, Berlin, Germany.

Bergey DH, Holt JG (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th edition (elektronisk utgave). Tilgjengelig på URL (dato: 22.05.09).
<http://books.google.com/books/lippincott?q=vibrio&hl=en&vid=ISBN9780683006032#PPA175,M1>

Bergh Ø, Samuelsen OB (2007) Susceptibility of corkwing wrasse *Symphodus melops*, goldsinny wrasse *Ctenolabrus rupestris*, and Atlantic salmon *Salmo salar* smolt, to experimental challenge with *Vibrio tapetis* and *Vibrio splendidus* isolated from corkwing wrasse. *Aquaculture International* 15: 11 – 18.

Bergthun PH (2009) Leppefisksuksess i Marine Harvest avd. Agder. *Norsk fiskeoppdrett* 6a: 43 – 45.

Bjordal Å (1988) Cleaning symbiosis between wrasse (Labridae) and lice infested salmon (*Salmo salar*) in mariculture. *International Council for the Exploration of the Sea, Mariculture Committee* 188/F 17: 8s.

Bjordal Å (1990) Sea lice infestation on farmed salmon: possible use of cleaner-fish as an alternative method for de-lousing. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1761: 85-9.

Bjordal Å, Brunvoll L, Mikkelsen KO (1991) Fangst av leppefisk. – *Fiskets Gang* nr 11: 15 – 16.

Bjordal Å (1992) Cleaning symbiosis as an alternative to chemical control of sea lice infestation of Atlantic salmon. s. 53 - 60. I: Thorpe JE, Huntingford FA (red). The importance of feeding behaviour for the efficient culture of salmonid fishes. World Aquaculture Workshops, No 4, World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes C, Garcia MT, Ventosa A (1996) *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 480 - 484.

Bricknell IR, Bruno DW, Stone J (1996) *Aeromonas salmonicida* infectivity studies in goldsinny wrasse, *Ctenolabrus rupestris* (L). Journal of Fish Diseases 19: 469 - 474.

Castro D, Santamaria JA, Luque A, Martinez-Manzanares E, Borrego JJ (1996) Antigen characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting Manila clams. Systematic and Applied Microbiology 19:231-239.

Collins KJ, Jensen AC, Mallinson JJ (1996) Observations of wrasse on an artificial reef. Kap 3, s 47-54. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse biology and use in aquaculture. Fishing news books. Oxford 1996. 283 s.

Collins RO, Ferguson DA, Bonniwell MA (1991) Furunculosis in wrasse. Veterinary Record 128: 43.

Colquhoun DJ, Sørum H (2001) Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. Microbial Pathogenesis 31: 213 - 219.

Colwell RR, Grimes DJ (1984) *Vibrio* diseases of marine fish populations. Helgoland Meeresuntersuchungen 37: 265-287.

Costello MJ, Bjordal Å (1990) How good is this natural control on sea lice? Fish Farmer 13: 44 - 46.

Costello MJ (1991) Review of the biology of wrasse (Labridae: Pisces) in northern Europe. Progress in Underwater Science, The Journal of the Underwater Association 16:29 - 51.

Costello MJ (1996 a) Development and future of cleaner-fish technology and other biological control techniques in fish farming. Kap 13 s. 171-184. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse biology and use in aquaculture. Fishing news books. Oxford 1996. 283 s.

Costello MJ (1996 b) Parasites and diseases of wrasse being used as cleaner-fish on salmon farms in Ireland and Scotland. Kap. 17 s. 211-227. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse biology and use in aquaculture. Fishing news books. Oxford 1996. 283 s.

Costello M (2009) The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. Short communication. Journal of Fish diseases 32: 115 - 118.

- Darwall WRT, Costello MJ, Donnelly og Lysaght s (1992). Implications of life-history strategies for a new wrasse fishery. *Journal of Fish Biology* 41 (Suppl. B):111-123.
- Decostere A, Haesebrouck F, Turnbull JF, Charlier G (1999) Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches, *Journal of Fish Diseases* 22: 1 – 11.
- Dipper FA (1981) The strange sex lives of British wrasse. *New Scientist* 14: 444 – 445.
- Egidius E (1987) Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review. *Aquaculture* 67: 15 – 28.
- Espeland SH, Nedreaas K, Mortensen S, Skiftesvik AB, Agnalt AL, Durif C, Harkestad L, Karlsbakk E, Knutsen H, Thangstad T, Jørstad K, Bjordal Å, Gjørseter J (2010) Kunnskapsstatus leppefisk Utfordringer i et økende fiskeri. *Fisken og Havet* nr 7. 35 s.
- Fiskeridirektoratet statistikk leppefisk (2009) Bruk av leppefisk i produksjon av laks og regnbueørret fordelt på fylke. Antall i 1000 stk. verdi i 1000 kroner.
<http://www.fiskeridir.no/fiskeridir/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur/laks-regnbueoerret-og-oerret>
- Frerichs GN, Millar SD, McManus C (1992) Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from healthy wrasse (*Ctenolabrus rupestris*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 48 - 49.
- Gibson DR, Smail DA, Sommerville C (1998) Infectious pancreatic necrosis virus: experimental infection of goldsinny wrasse, *Ctenolabrus rupestris* L. (Labridae). *Journal of Fish Diseases* 21: 399 – 406.
- Gomez-Gil B, Roque A (2006) Isolation, enumeration, and preservation of the *Vibrionaceae*. s 15-26. I: Thompson FL, Austin B, Swings J (red) *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington DC. 423s.
- Gravningen K, Kvenseth PG, Hovlid RO (1996) Virulence of *Vibrio anguillarum* serotypes 01 and 02, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and atypical *Aeromonas salmonicida* to goldsinny wrasse. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) *Wrasse biology and use in aquaculture*. Fishing news books. Oxford 1996. Kap. 20 s. 247 – 250.
- Green JM, Farwell (1971) Winter habits of the cunner, *Tautogolabrus adspersus* (Walbaum 1972), in Newfoundland. *Canadian Journal of zoology* 49: 1497-1499.
- Grizez L, Ceusters R, Ollevier F (1991) The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 14: 359-365.
- Hilldén NO (1984) behavioural ecology of the labrid fishes (Teleostei: Labridae) at Tjärnö on the Swedish west coast. Akademisk avhandling, *Dr. philos*, Stockholm Universitet, Sverige. 107 s. ISBN 91-7146-283-X.

Hjartholm S (1996) Leppefisk økologisk betydning. SMR rapport 23/96. UIB Senter for Miljø- og ressursstudier 14 s.

Hjeltnes B, Bergh Ø, Wergeland H, Holm JC (1995) Susceptibility of Atlantic cod *Gadus morhua*, halibut *Hippoglossus hippoglossus* and wrasse (Labridae) to *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and the possibility of transmission of furunculosis from farmed salmon *Salmo salar* to marine fish. *Diseases of Aquatic organisms* 23: 26 – 31.

Heuch PA, Bjørn PA, Finstad B, Holst JC, Asplin L, Nilsen F (2005) A review of the Norwegian "National action plan against salmon lice on salmonids": the effect on wild salmonids. *Aquaculture* 246:79–92.

Høisæther T, Lein TE, Fosså JH (1993) Tareskogens betydning for kystnære fiskebestander. IFM-rapport nr. 8, 1993. IFM, Universitetet i Bergen 67 s.

Ishimaru K, Akagawa-Matsushita M, Muroga K (1996) *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 155 – 159.

Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C, Bergh Ø (2003) Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 53:25-31.

Jensen S, Frost P, Torsvik VL (2009) The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles. *FEMS Microbiol Lett* 294:207 – 215.

Johnson SC, Treasurer JW, Bravo S, Nagasawa K, Kabata Z (2004) A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies* 43:229–243.

Kabata Z (1979) Parasitic copepoda of British Fishes. The Ray Society, London, vol. 152 (Om Caligidae, s 156 – 199.

Karlsbakk E, Hodneland K, Nylund A (1996) Health status of goldsinny wrasse, including a detailed examination the parasite community at Flødevigen, southern Norway. Kap. 18 s. 228-239. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse biology and use in aquaculture. Fishing news books. Oxford 1996.

Karlsbakk E, Askeland J, Nylund B (2011) Parasitter på berggylte. *Norsk Fiskeoppdrett* nr 6A: 59.

Kim DH, Han HJ, Kim SM, Lee DC, Park SI (2004) Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 27:497 – 505.

Kirkemo AM, Bergh Ø, Samuelsen OB (2003) Sykdom hos leppefisk. *Rensefisk. Norsk Fiskeoppdrett* nr 12A: 32-35.

- Kvenseth PG (1993a) Leppefisk brukt i storskala oppdrett – erfaringer fra AS Mowi. Norsk Fiskeoppdrett nr 6:24-25.
- Kvenseth PG (1993b) Oppdrett av leppefisk – snart en realitet? Norsk Fiskeoppdrett nr. 9:28-29.
- Kvenseth PG (1996) Large-scale use of wrasse to control sea lice and net fouling in salmon farms in Norway. Kap. 15 s. 196-203. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse biology and use in aquaculture. Fishing news books. Oxford 1996.
- Kvenseth PG (1997) Best current practice for lice control in Norway. Caligus 2: 4-9.
- Kvenseth PG, Solgaard J (2003) Liten fisk gjør stor nytte. I: Rensefisk. Norsk Fiskeoppdrett nr. 12A: 4-7.
- Kvenseth PG, Solgaard J, Andreassen J (2003) Mer leppefisk, takk! S 44-46. I: Ervik A, Kiessling A, Skilbrei O, van der Meeren T (red.) Havbruksrapporten. Fisken og havet, særnr. 3-2003.
- Laidler LA, Treasurer JW, Grant AN, Cox DI (1999) Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in wrasse (*Labridae*) used as cleaner fish of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in Scotland. Journal of Fish Diseases 22:209-213.
- Larsen JL, Pedersen K (1999) Infeksjoner med *Vibrio*-bakterier. S. 68 - 83. I: Poppe T (red). Fiskehelse og fiskesykdommer. Universitetsforlaget..
- Le Roux F og Austin B (2006) *Vibrio splendidus*. Kap. 21, s 285 - 296. I: Thompson FL, Austin B, Swings J (red). The biology of *Vibrios*. ASM Press, Washington DC.
- Lightner DV (1993) Diseases of cultured penaeid shrimp s. 393-486. I: McVey, JP (red), CRC Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Raton, FL.
- López JR, Balboa S, Núñez S, De la Roca E, De la Herran R, Navas JI, Toranzo AE, Romalde JL. (2011) Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). Research in Veterinary Science 90: 189–195.
- Lundblad G, Bakke CK, Rimstad E (2010) Leppefisk – mulig vektor for virus for laksefisk og marin fisk i opprett? Poster, Havbrukskonferansen 2010.
- Maes P, Paillard C (1992) Effect du *Vibrio* P1, pathogène de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves. Les mollusques marins, biologies et aquaculture. IFREMER. Actes Colloq 14: 141 – 148.
- Mordue (Luntz) AJ, Birkett MA (2009) A review of host finding behavior in the parasitic sea louse, *Lepeophreirus salmonis* (Caligidae: Copepoda). Journal of Fish Diseases 32: 2 -13.
- Mortensen SH, Strand Ø (2000) Releases and recaptures of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) introduced to Norway. Short communication, SARSIA 85:87-91.

Nilsen F (2008) Påvisning av Emamectinresistente lakselus i Noreg. Norsk fiskeoppdrett 6:58-60.

Nilsen F (2011) Salmon louse research centre. "SFI på lakseluskontrol". Foredrag. http://www.fiskeriforum.no/uploads/media/1_Frank_N_Lakselus_SFI_M%C3%B8teplassMarin.pdf

Novoa B, Luque A, Castro D, Borrego GG, Figueras (1998) Characterization and infectivity of four bacterial strains isolated from Brown Ring Disease-affected clams. Journal of invertebrate pathology 71: 34-41.

Nylund A, Bjørknes B, Wallace C (1991) *Lepeophtheirus salmonis* – a possible vector in the spread of diseases on salmonids. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 11: 213 - 216.

Paillard C, Maes P (1990) Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, t 310, Série III: 15 – 20.

Paillard C, Maes P, Outbella R (1994) Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 4: 219 - 240.

Paillard C (2004) Review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams. Aquatic living resources 17: 467 - 475.

Paillard C, Allam B, Oubella R (2004) Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Diseases of Aquatic Organisms 59: 249-262.

Paillard C, Gausson S, Nicolas JL, Le Pennec JP, Haras D (2006) Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. Aquaculture 253: 25 - 38.

Paillard C, Korsnes K, Le Chevalier P, Le Boulay C, Harkestad L, Eriksen AG, Willasen E, Bergh Ø, Bovo C, Skår C, Mortensen S (2008) *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. Diseases of Aquatic Organisms 18: 153-161.

Petterson E, Sandberg M, Santi N (2009) Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases 32: 477-9.

Pike AW, Wadsworth SL (2000) Sealice on salmonids: their biology and control. Advances in Parasitology 44: 232 - 337.

Potts, G.W. (1984) Parental behaviour in temperate marine teleosts with special reference to the development of nest structures. In fish Reproductions, Strategies and Tactics (Ed. By Potts, G. W: og Wotton, R. J.). Academic Press, London, pp. 223-44.

- Quignard JP, Pras A (1986) Labridae, s 919 - 942. I: Whitehead, PJP, Bauchot, ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (red). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean Vol. II Paris: UNESCO.
- Reid HI, Duncan HL, Laidler LA, Hunter D, Birkbeck TH (2003) Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L) Aquaculture 221: 65-74.
- Rodewald P, Øien R (2006) Undersøkelse av den relative effektiviteten til grønnngylt, gressgylt, bergnebb og berggylt med hensyn på beiting av lakselus og begroingsorganismer. Bacheloroppgave i akvatisk biologi, Institutt for Biologiske fag, Høgskolen i Ålesund. 36 s.
- Ruby EG, Lee K (1998) Mini review. The *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ association: Current ecological paradigms. Applied and Environmental Microbiology 64: 805 - 812.
- Samuelsen OB, Husgarð S, Torkildsen L, Bergh Ø (2000) The efficacy of a single intraperitoneal injection of flumequine in the treatment of systemic vibriosis in corkwing wrasse *Symphodus melops*. Journal of Aquatic Animal Health 12: 324 - 328.
- Samuelsen OB, Ervik A, Torkildsen L, Bergh Ø (2002) The efficacy of a single intraperitoneal injection of either flumequine or oxytetracycline hydrochloride in prevention of outbreaks of atypical *Aeromonas salmonicida* infection in goldsinny wrasse, *Ctenolabrus rupestris* L., following stress. Aquaculture International 10:257-264
- Samuelsen OB, Kvenseth PG, Andreassen JH, Torkildsen L, Ervik A, Bergh Ø (2003) The efficacy of a single intraperitoneal injection of oxolinic acid in the treatment of bacterial infections in goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) and corkwing wrasse (*Symphodus melops*) studied Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 26:181-186
- Sanger F, Nicklen S, Coulson R (1977) DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science, USA 74: 5463 - 5467.
- Santos Y, Romalde JL, Bandin i, Magarinos B, Nunez S, Barja JL, Toranzo AE (1993) Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquaculture 116: 11-120.
- Sayer MDJ, Gibson RN, Atkinson RJA (1993) Distribution and density of populations of goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) on the west coast of Scotland. Journal of Fish Biology 43: (suppl. A), 156 -167.
- Sayer MDJ, Cameron KS, Wilkinson G (1994) Fish species found in the rocky sublittoral during winter months as revealed by the underwater application of the anaesthetic quinadine. Brief Communication. Journal of Fish Biology 44: 351-353.
- Sayer MDJ, Treasurer JW (1996) North European wrasse: identification, distribution and habitat. Kap 1, s 3-12. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse, biology and use in aquaculture. Fishing News Books, Oxford 1996. 283 s

Siftesvik AB, Opstad I, Muncaster S (2007) Nytt på leppefiskfronten: yngelproduksjon av berggylte. Norsk Fiskeoppdrett nr. 4 s. 56 - 57.

Skog K, Mikkelsen KO, Bjordal Å (1994) Leppefisk – tilgjengelighet og fangstmuligheter i perioden februar - juni. Fisken og Havet 4: 1- 34.

Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. WH Freeman and Co. New York. 887 s.

Solgaard J, Øien R, Kvenseth PG (2006) Grønngylt som lusebeiter til små laks? Norsk Fiskeoppdrett 12: 48 - 49.

Stone J (1996) Preliminary trials on the culture of goldsinny and corkwing wrasse. Kap. 12 s. 142-167. I : Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Wrasse biology and use in aquaculture. Fishing news books. Oxford 1996.

Thompson FL, Tetsuya I, Swings J (2004) Biodiversity of vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 403 - 431.

Thompson FL, Swings J (2006) Taxonomy of the vibrios. Kap. 3, s 29 - 64. I: Thompson FL, Austin B, Swings J (red). The biology of *Vibrios*. ASM Press, Washington DC. 423 s.

Topic Popovic N, Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic I (2007) Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. Veterinarni Medicina 52:49-53.

Toranzo AE, Magarinos B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246: 37 - 61.

Treasurer JW, Cox D (1991) The occurrence of *Aeromonas salmonicida* in wrasse (Labridae) and implications for atlantic salmon farming. Bulletin of the European Association of Fish Pathology 11: 208.

Treasurer JW, Laidler LA (1994) *Aeromonas salmonicida* infections in wrasse (Labridae) used as cleaner fish, on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farm. Journal of Fish diseases 17: 155-161.

Treasurer JW (1996). Wrasse (Labridae) as cleaner-fish of sea lice on farmed Atlantic salmon in west Scotland. Kap. 14, s.185 - 195. I: Sayer MDJ, Treasurer JW, Costello MJ (red) Fishing News Books, Oxford 1996.

Treasurer JW (1997) Parasites of wrasse (Labridae) in inshore waters of west Scotland stocked as cleaner fish of sea lice (Caligidae) on farmed Atlantic salmon. Journal of Fish Biology 50: 895 – 899.

Treasurer J W, Wadsworth S, Grant A (2000) Resistance of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer), to hydrogen peroxide on farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture Research 31: 855–860.

Tully O, Nolan DT (2002) A review of the population biology and host–parasite interactions of the sea louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasitology* 124: 165 - 182.

Uglem I, Galloway TF, Rosenquist G, Folstad I (2001) Male dimorphism, sperm traits and immunology in the corkwing wrasse (*Symphodus melops* L.) *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50:511-518.

Vandenberghe J, Thompson FL, Gomez-Gil B, Swings J (2003) Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219: 9 - 20.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD and others (1987) Report of the ad – hoc – committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 463 – 464.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697 – 703.

Yamamoto S, Harayama S (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1104 – 1109.

Petterson E, Sandberg M, Santi N (2009) Salmonid alphavirus associated with *Leopphtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 32: 477 – 479.

Rusanganwa E, Singh B, Gupta RS (1992) Cloning of HSP60 (GroEL) operon from *Clostridium perfringens* using a polymersase chain reaction based approach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1130: 90 – 94.

VEDLEGG

Vedlegg A. Medier og løsninger

Marin agar (MA)

Marin agar (MA) er det mest benyttede mediet for kultivering av marine bakterier fra omgivelsene/miljøet ([Gomez-Gil og Roque 2006](#)). Mediet ble opprinnelig utviklet av Zobell og kalt Marine agar 2216E. MA er ikke et selektivt medium, og nærmest alle vibriobakterier, i tillegg til mange andre bakterier, vil kunne vokse på dette mediet ([Gomez-Gil og Roque 2006](#)).

TCBS agar

Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) er et *Vibrio*-selektivt medium som ble utviklet av [Nakanishi \(1962\)](#) og modifisert av [Kobayashi m.fl. \(1963\)](#) ; [Gomez-Gil og Roque \(2006\)](#). TCBS er det mest benyttede mediet for isolering av *Vibriobakterier*. TCBS er et ideelt medium for selektiv isolering og rendyrking av *Vibriobakterier*, selv om noen andre bakteriestammer (stafylokokker, flavobakterier, *Pseudoalteromonas*, streptokokker, *Aeromonas* og *Shewanella*) kan vokse på mediet. Disse bakteriene vil imidlertid ikke vokse optimalt, mens de fleste vibriobakterier vokser til store kolonier med forskjellig kolonimorfologi på skålen. Gram-positive og koliforme bakterier blir sterkt hemmet på grunn av at mediet inneholder gallesalter. *Vibrio*-bakterier som kan fermentere sukrose vil danne gule kolonier, mens sukrose-negative stammer vil danne grønne kolonier på mediet. Man bør imidlertid være oppmerksom på at eldre kulturer (mer enn 48 timer), nedkjølte plater eller overgrodde skåler kan gi endring av farge på bakteriekoloniene, derfor må fargen kun registreres fra nye og separate kolonier ([Gomez-Gil og Roque 2006](#)).

Trypton soya medium (TSB)

TSA og TSB (henholdsvis agar og broth) er kanskje det mest benyttede mediet for dyrking av marine bakterier, forutsatt at en optimal mengde NaCl tilsettes. Det er nødvendig med en total mengde NaCl mellom 1,5 og 2,5 % ([Gomez-Gil og Roque 2006](#)).

Oxidasetest

Oxidasetest er en kvalitativ metode for påvisning av cytochrom c - oxidaseaktivitet i bakterier. Enzymet cytochrom c katalyserer overføringen av elektroner til oksygen i den aerobe respirasjonskjeden. Til oxidasetesten brukes en kunstig elektronakseptor, p-phenylenediamine (oksidasereagens). Bakterier som inneholder cytochrom c som en del av sin respiratoriske kjede, vil oksidere p-phenylenediamine og gi en positiv test (reagenset blir blått). Organismer som ikke inneholder cytochrom c som en del av sin respiratoriske kjede, oksiderer ikke reagensen og testen blir negativ (ingen fargeforandring av reagensen).

Fremgangsmåte: Kolonier fra en agarskål plukkes med en steril podenål på et filtrerpapir med oksidasereagens. Vi benyttet Oxidasetest (Bactident®) (MERCK). En fargereaksjon fremkommer etter noen sekunder ved positiv reaksjon.

Sensitivitet til vibriostatikum O/129

En lapp med O/129 (10 µl) ble plassert i sentrum av Marinagarskålen. Dersom bakterien var sensitiv mot dette vibriostatikumet, ble det dannet en sone med hemmet vekst (hemmingssone) rundt lappen.

5 x TBE-buffer (Tris Borate)

(Mengde: 1 liter)

54 g Tris base

27,5 g Boric acid

20 ml 0,5 M EDTA

Fyll på med destillert H₂O til 1 liter

10 x Phosphate Buffered Saline (PBS)

(Mengde: 5 liter)

425 g NaCl

12,7 g KH₂PO₄

42,7 g Na₂HPO₄ 2H₂O

Fyll på med destillert H₂O til 5 liter

Vedlegg B. Resultater fra sekvenseringer, og API 20E – profiler av bakterieisolater fra forsøk 3

Tabell B1. Sekvenseringsresultater basert på 16S rRNA-, *GyrB* - og *Cpn60* - genene fra isolater i forsøk 3 ved 12 °C, som var positive på *Vibrio tapetis* - PCR, mens API - profilene var forskjellige fra smittebakteriene. Rød markering viser funn av *Vibrio* sp med høyest likhet til *V. ichthyoenteri*, og blå markering viser funn av *Vibrio* sp med høy likhet til *V. splendidus* LP1. API 20E - profilene for disse isolatene er vist i tabell B2. Fullstendig oversikt over alle isolatene som ble sekvensert fra dette forsøket, er vist i tabell B5 – B8.

Sekvenserte isolater fra forsøk 3 ved 12 °C, med positiv <i>V. tapetis</i> - pcr, men API - profil forskjellig fra smittebakterien			
Isolat nr	16S rRNA	GyrB	Cpn60
14		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
15		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (99 %)
17		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (98 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
28		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
32		<i>Vibrio splendidus</i> LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
33	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> HQ010223-1 (99 %)	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 GyrB (91 %)	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 (87 %)
40		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
43		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
44		<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 33125 og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
45		<i>Vibrio splendidus</i> ATCC 33125 og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> s LGP32 (98 %)
54		<i>Vibrio splendidus</i> LT06 og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
61		<i>Vibrio splendidus</i> LT06 og LP1 (99 %)	Ubrukelig sekvens
62	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> FK-1 (95 %)	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 (91%)	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 (86 %)
64	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 (98 %)	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 (90%)	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 (86 %)
65		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
80		<i>Vibrio splendidus</i> FALZ90 og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
93		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 (99 %) og LP1 (98 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
94	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> FK-1 (98 %)	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 (91 %)	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 (86 %)
96		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
97		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 og LP1 (98 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
98	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> HQ010223-1 (99 %)	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 (91 %)	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 (86 %)
100	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> FK-1 (98 %)	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> ATCC 700023 (91 %)	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 (86 %)
126		<i>Vibrio splendidus</i> SPR1124 og LP1 (99 %)	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)

API - resultater fra forsøk 3, ved 12 °C

Tabell B2. API resultater fra bakterieisolater fra forsøk 3, 12 °C, som ikke hadde identisk API 20E - profil til bakterieisolatet fiskene var smittet med, men som var positive på *Vibrio tapetis* spesifikk PCR. Resultater fra sekvensering av disse isolatene er vist i tabell B1.

SUBSTRAT	ISOLATNUMRE																						
	14	15	17	28	32	33	40	54	61	62	65	80	93	94	96	97	98	126	43	44	45	100	126
ONPG	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	(+)	(+)	(+)	+	-	(+)	-	-	-	-	+	(+)	-	(+)	+	-	-	+	+	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	?	?	?	-	?	-	-	?	-
GEL	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabell B3. Resultater fra sekvensering av isolater fra forsøk 3, 15 °C basert på 16S rRNA, *Gyrb* - og *cpn60* – gen. Isolatene var positive på *Vibrio tapetis* – PCR, men hadde API - profil som var forskjellig fra smittebakterien. Grønn markering viser funn av *V. tapetis*. Rød markering viser funn av *Vibrio* sp. med høyest likhet til *V. ichthyoenteri*, og blå markering viser funn av *Vibrio* sp med høy likhet til *V. splendidus* LP1. API 20E - profilene for disse isolatene er vist i tabell B4.

Sekvenserte isolater med positiv <i>V. tapetis</i> pcr, men API-profil forskjellig fra smittebakterien, fra forsøk 3, ved 15 °C			
Isolat nr	16S rRNA	<i>Gyrb</i>	<i>Cpn60</i>
54	<i>Vibrio ichthyoenteri</i> HQ010223-1 (99 %)		<i>Vibrio harveyi</i> ATCC35084 Hsp60 (87 %)
64	Ubrukelig sekvens	<i>Vibrio splendidus</i> LT06 strain AJ515282 (99 %), LP1 (99 %)	<i>Vibrio</i> sp. SPRZ103, sjøvann USA
77	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD, CECT4600 (99 %) og LP2 (99 %)		
105	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT4600 99 % og LP2 (99 %)		<i>Vibrio tapetis</i> LP2 (99 %) og CECT 4600 (99 %)
117	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD, CECT4600 (99 %) og LP2 (99 %)		<i>Vibrio tapetis</i> LP2, og CECT 4600 (99 %)
121	<i>Vibrio splendidus</i> Mj168 (98 %)		<i>Vibrio</i> sp. aff <i>splendidus</i> Baktoplankton Ma USA, nærmeste med ID er <i>V. spl</i> LGP32 (96 %)
127			<i>Vibrio</i> sp. aff <i>splendidus</i> Baktoplankton Ma USA, nærmeste med ID er <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (96 %)
142	<i>Vibrio splendidus</i> LP1 (99 %)		<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %) og SPR1119 (99 %)
166	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT4600 (99 %) og LP2 (99 %)		Dårlig sekvens
179	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD CECT4600 (99 %) og LP2 (99 %)		<i>Vibrio tapetis</i> LP2, og CECT 4600 (99 %)
181	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32		<i>V. cycliotrophicus</i>
185	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD, CECT4600 (99 %) og LP2 (99 %)		<i>Vibrio tapetis</i> partial <i>hsp60</i> gene for heat shock protein 60, strain LP2 (>99 %)
186	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD, CECT4600 (99 %) og LP2 (99 %)		

API - resultater fra forsøk 3, ved 15 °C

Tabell B4. API resultater fra bakterieisolater fra døde fisk i forsøk 3, 15 °C, som ikke hadde identisk API - profil som bakterieisolatet fiskene var smittet med, men som var positive på *Vibrio tapetis* - PCR. Resultater fra sekvensering av disse isolatene er vist i tabell B3.

SUBSTRAT	ISOLATNUMRE													
	LP2	54	64	77	105	117	121	127	142	166	179	181	185	186
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sekvenserte isolater fra forsøk 3, ved 12 °C

Tabell B5. Isolater fra kontrollgruppene som ble sekvensert fra forsøk 3 ved 12 °C. Blastsøk er basert på sekvensering av 16S rRNA - gen.

Isolat nr.	ISOLATER FRA KONTROLLGRUPPER – RESULTATER FRA BLASTSØK
30	<i>Vibrio splendidus</i> LG32 chromosome1 99 %
49	<i>Vibrio splendidus</i> LG32 chromosome1 99 %
50	<i>Vibrio splendidus</i> LG32 chromosome1 99 %
71	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnA (99 %), <i>Vibrio splendidus</i> strain LP1 (99 %)
75	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnF (99 %)
76	Vokste ikke opp etter nedfrysing
77	<i>Marine bacterium</i> (99 %), <i>V. tasmaniensis</i> , <i>V. cyclitrophicus</i>
78	<i>V. splendidus</i> PBI-10rrnH, LMG 23856 (99 %), LG32 chromosome1 (99 %)
102	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnH (99 %), <i>Vibrio sp.</i> LMG 23856 (99 %), <i>Vibrio tasmaniensis</i> , <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
103	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnH (EU091332.9)(99 %), <i>Vibrio tasmaniensis</i> LMG 21574T (99 %) <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
104	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> Mj149 (97 %), <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (97 %)
105	<i>Vibrio splendidus</i> isolat PB1-10rrnH (99 %), <i>Vibrio tasmaniensis</i> Mj9 (99 %), <i>Vibrio cyclitrophicus</i> Mj175 (99 %), <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
106	<i>Vibrio splendidus</i> Mj82 (93 %)
107	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
108	<i>Vibrio splendidus</i> LG32 chromosome 1 (99 %)
109	<i>Vibrio ichthyenteri</i> (99 %), <i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158 (98 %),
110	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnH (99 %), <i>Vibrio tasmaniensis</i> (99 %), <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
111	Div <i>Vibrio splendidus</i> . (LP1 99 %, LG32 chromosome1 99 %)
112	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnA (99 %) <i>Vibrio splendidus</i> LP1 (99 %)
113	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnA (99%), <i>Vibrio splendidus</i> LP1 (99%), <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
114	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (97 %), <i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnE (97 %), <i>Vibrio tasmaniensis</i> (97 %)

Tabell B6. Sekvenserte isolater fra forsøk 3 ved 12 °C, etter smitte med NRP45. Blastsøk er basert på sekvensering av 16S rRNA - og / eller *Cpn60* gen. Grønn markering viser funn av *V. tapetis*. Rød markering viser funn av *Vibrio* sp. med høyest likhet til *V. ichthyoenteri*, og blå markering viser funn av *Vibrio* sp med høy likhet til *V. splendidus* LP1.

Isolat nr.	Sekvensert gen	ISOLATER ETTER SMITTE MED NRP45 - Resultat fra blastsøk
15	16S rRNA	<i>Vibrio cyclithrophicus</i> Mj149 (98%), <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1
16	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), <i>Vibrio tapetis</i> IS1 (99 %), <i>Vibrio tapetis</i> B8.3 (99 %), <i>Vibrio tapetis</i> CMJ10.7 (99 %), <i>Vibrio tapetis</i> CECT 4600 (99 %), LP2 (99 %)
17	16S rRNA	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (98 %), <i>Vibrio cyclithrophicus</i> Mj149 (98 %)
20	16S rRNA	<i>Vibrio splendidus</i> PB1-10rrnH (99 %)
29	16S rRNA	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (99 %)
32	<i>Cpn60</i>	<i>Vibrio splendidus</i> LP1 (99 %)
40	16S rRNA	<i>Vibrio cyclithrophicus</i> Mj149 (98 %), <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 (98 %)
41	<i>Cpn60</i>	<i>Vibrio splendidus</i> LP1 (100 %)
46	<i>Cpn60</i>	<i>Vibrio splendidus</i> LP1 (99 %)
47	<i>Cpn60</i>	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32 chromosome 1 (97 %)
48	<i>Cpn60</i>	<i>Vibrio harveyi</i> strain NB1014 (86 %)
	16S rRNA	<i>Vibrio scophthalmi</i> LMG 19158 (98 %), <i>Vibrio ichthyoenteri</i> DSM 14397T (98 %)

Tabell B7. Sekvenserte isolater fra forsøk 3 ved 12 °C, etter smitte med CECT 4600. Blastsøk er basert på sekvensering av 16S rRNA - *Cpn60* - og *Gyrb* gen. Rød markering viser funn av *Vibrio* sp. med høyest likhet til *V. ichthyenteri*, og blå markering viser funn av *Vibrio* sp med høy likhet til *V. splendidus* LP1.

Isolat nr.	Sekvensert gen	ISOLATER ETTER SMITTE MED CECT 4600 - Resultat fra blastsøk
43	<i>Cpn60</i>	<i>V. splendidus</i> LGP32 (98 %)
	<i>Gyrb</i>	<i>V. splendidus</i> SPR1124 (99 %), <i>V. splendidus</i> LP1 (99 %).
44	<i>Cpn60</i>	<i>V. splendidus</i> LGP32 (98%)
	<i>Gyrb</i>	<i>V. splendidus</i> ATCC 33125, <i>V. splendidus</i> LP1 (99 %).
45	<i>Cpn60</i>	<i>V. splendidus</i> LGP32 (98 %)
	<i>Gyrb</i>	<i>V. splendidus</i> ATCC 33125, <i>V. splendidus</i> LP1 (99 %).
100	16S rRNA	<i>V. Ichthyenteri</i> , isolat FK-1 (98 %)
	<i>Gyrb</i>	<i>V. Ichthyenteri</i> ATCC 700023 (91 %)
	<i>Cpn60</i>	<i>V. harveyi</i> ATCC 35084 (86 %)

Tabell B8. Sekvenserte isolater fra forsøk 3 ved 12 °C, etter smitte med LP2. Blastsøk er basert på sekvensering av 16S rRNA – og *Cpn60* gen. Grønn markering viser funn av *V. tapetis*.

Isolat nr.	Sekvensert gen	ISOLATER ETTER SMITTE MED LP2 - Resultat fra blastsøk
9	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT 4600 og LP2 (99 %)
	<i>Cpn60</i>	
18	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT 4600 og LP2 (99 %)
	<i>Cpn60</i>	
19	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT 4600 og LP2 (99 %)
	<i>Cpn60</i>	
31	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT 4600 og LP2 (99 %)
	<i>Cpn60</i>	
42	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT 4600 og LP2 (99 %)
	<i>Cpn60</i>	
53	16S rRNA	<i>Vibrio tapetis</i> GR0202RD (99 %), CECT 4600 og LP2 (99 %)
	<i>Cpn60</i>	
54	<i>Cpn60</i>	<i>Vibrio harveyi</i> strain ATCC35084 Hsp60 (87%)
	16S rRNA	Ubrukelig sekvens

Vedlegg C. Patologi hos døde fisk fra forsøkene

Tabell C1. Patologi hos døde fisk fra forsøk 1, smittet med LP2. I kolonnen "Smittegruppe" står forkortelsene HD, MD og LD for henholdsvis høy-, middels- og lav dose. K = kontroll. B eller S står for henholdsvis bad eller stikk. Under kolonnen "mengde", representerer "+" 1-10 kolonier "++" 10-50 kolonier og "+++" >100 kolonier.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
1	2	HDB	hunn	Gul	++	+	Ok	Ascites
2	5	MDS	hunn	Gul	+++	+	Ok	Ascites
3	5	MDS	hunn	Gul	+++	+	Ok	Autolyserte innvoller
4	6	MDS	hunn	Gul	+	+	Ok	Ok
5	7	LDS	hunn	Gul (fryst)	+	+	Ok	Blodig ascites
6	8	LDS	hunn	Gul	+++	+	Ok	Autolyserte innvoller
7	8	LDS	hann	Gul	+++	+	Sår rygg	Blodig ascites
8	9	MDS	hann	Gul	++	+	Ok	Ascites
9	10	MDS	hunn	Gul	+++	+	Ok	Blodig ascites, autolyserte innvoller
10	11	MDB	hunn	Gul	+++	+	Ok	Ascites
11	12	HDB	hann	Gul	+++	+	Sår rygg og hode	Ok
12	14	HDB	hann	Gul	+++	+	Sår rygg	Væskefylt, utspilt tarm
13	14	HDS	hann	Gul (fryst)	+	-	Ok	Ascites
14	14	MDS	hunn	Gul	+++	+	Ok	Ascites
15	15	MDS	hunn	Gul	+++	+	Stort sår buk	Ascites
16	16	KB	hunn	Grønn	+++	-	Sår buk	Ascites
17	18	HDB	hann	iv		-	Sår gjellelokk og hode (LP2)	Ok
18	18	HDB	hunn	iv		-	Ok	Ok
19	18	HDS	hunn	Gul	+	+	Sår siden og gatt	Ascites
20	18	HDS	hunn	lv		-	Ok	Ok
21	20	HDS	hunn	Gul	+++	+	Ok	Væske tarm, ascites
22	20	KB	hunn	Gul/Grønn	+++/+	+/-	Sår buk	Blødn tarm, ascites, rennende nyre
23	20	HDB	hunn	lv		-	Ok	Ok
24	22	HDS	hann	Gul	+	-	Sår buk	Mye ascites

Tabell C1, forts. Patologi hos døde fisk fra forsøk 1

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
25	26	KS	hunn	lv		-	Sår buk	Ok
26	27	KS	hunn	lv		-	Ok	Ok
27	27	HDS	hann	lv (Vekst MA)	+	-	Sår bukside	Ascites
28	28	KS	hunn	iv		-	Ok	Ok
29	29	LDS	hann	lv (Vekst MA)	+	-	Sår rygg	Mye ascites
30	33	LDB	hann	iv		-	Sår siden	Ok
31	33	HDB	hunn	iv		-	Ok	Ok
32	33	HDS	hann	iv		-	Sår bukside	Ok

Tabell C2. Patologi hos døde fisk fra forsøk 2, smittet med LP2 ved 6, 9, 12 og 15 °C

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
1	6	9 °C	K	hunn	Fet gul	+	-	Sår gatt, sår siden	Ok
2	6	12 °C	A1	hann	Fet gul/liten gul	+/+	-	Ok	Ok
3	6	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Ok	Autolyserte innvoller
4	7	15 °C	A1	hann	Gul	+++	+	Sår hale	Ascites
5	8	9 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Sår gatt	Svullen milt, blod ascites, blødn. rogn
6	8	12 °C	A2	hann	Gul	+++	+	Ok	Ascites
7	9	15 °C	A1	hunn	Blågrønn	++	-	Sår rygg	Svullen milt, ascites
8	9	12 °C	A1	hunn	Gul	+++	-	Ok	Svullen milt, blod ascites
9	10	12 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Stort sår på I siden	Ascites
10	10	12 °C	A2	?? FOTO	Gul	+++	+	Røde gjellelokk, sår siden	Blod ascites
11	11	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Røde gj lokk, sår siden	Ascites
12	11	15 °C	A1	hunn	Gul	+	-	Røde gjellelokk	Ok
13	11	15 °C	A1	hunn	Gul/stor gul	+++/+	+/-	Ok	Svullen milt
14	12	12 °C	K	hunn	iv	-	-	Ok	Ok
15	12	15 °C	K	hann	Grønn	+	-	Ok	Ok
16	12	12 °C	A1	hann	Gul	+++	+	Sår rygg	Svullen milt
17	12	12 °C	A1	hann	Gul	+++	+	Sår finner	Svullen milt
18	12	12 °C	A1	hunn	Liten gul/stor gul	+++/+	+/-	Stort sår i siden	Ascites
19	12	6 °C	A1	hann	Gul	+++	+	snutesår	Punktblødn lever og tarm
20	12	6 °C	K	hunn	iv			Blodutredelser i hud	Ascites
21	13	9 °C	K	hunn	Gul	+	-	Sår i siden	Blodig ascites
22	13	9 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Sår i siden	Blodig ascites
23	13	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Blødn hode	Blodig ascites
24	13	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Ok	Blodig ascites
25	13	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Oppspist buk	Innvoller manglet
26	13	6 °C	A1	hunn	Gul	+	-	Rødt gatt, sår snute	Blodig ascites
27	13	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Sår rygg, sår snute	Blodig ascites
28	13	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Ok	Blodig rogn

Tabell C2, forts. Patologi hos døde fisk fra forsøk 2

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
29	13	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Blodig gatt, mange sår	Svullen milt, ascites
30	13	12 °C	K	hunn	Fet gul	+	-	Ok	Blødn. gonade
31	14	15 °C	A2	hunn	iv (avlivet)	-	-	Manglet øye	Ok
32	15	12 °C	K	hunn	iv	-	-	Sår snute	Ok
33	15	12 °C	K	hann	iv	-	-	Sår hale	Ok
34	15	15 °C	A2	hann	Liten gul/stor gul	+++/+	+/-	Bleik fisk	Autolyserte innvoller
35	16	12 °C	K	hunn	iv	-	-	Sår brystfinne	Ok
36	16	15 °C	A2	hunn	Ikke prøve	-	-	Bleik fisk	Autolyserte innvoller
37	16	9 °C	A2	hann	Gul	+	+	Sår buk og i siden	Væske tarm
38	16	9 °C	A2	hann	Gul	+++	+	Sår bukfinne	Ascites
39	16	9 °C	A2	hunn	Liten gul/Blå	+++/+	+	Sår gatt og buk	Ascites
40	16	12 °C	A2	hunn	Gul	++	+	Ok	Ascites
41	16	9 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Bleik fisk	Autolyserte innvoller
42	16	9 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Mange sår	Ascites
43	17	9 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Mange sår	Ascites
44	17	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Sår gatt	Ascites
45	17	12 °C	K	hunn	iv	-	-	Ok	Rød tarm
46	17	12 °C	K	?	Gul	+	-	Rødhet i hode	Svullen milt
47	17	12 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Ok	Svullen milt, blodig ascites
48	17	12 °C	A1	?	Gul	+++	+	Stort sår i siden	Svullen miilt, ascites, væske tarm
49	18	6 °C	K	hunn	Gul/Grønn	+/+	-/-	Stort sår i siden	Væske tarm
50	18	12 °C	A1	hunn	grønne	+/+	+/-	Sår gjellelokk	Væske tarm
51	18	12 °C	A1	hann	Gulgrønn	++	-	Sår halerot	Indre organer oppløst
52	18	12 °C	A2	hann	Gul	+++	+	Haleråte	Svullen milt, autolyserte innvoller
53	18	12 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Sår rygg	Autolyserte innvoller
54	18	15 °C	A1	hann	Gul/ Feit hvit	+/+	+/-	Ok	Væske tarm
55	18	15 °C	A1	hann	Gul	+++	-	Ok	Rød inni

Tabell C2, forts. Patologi hos døde fisk fra forsøk 2

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
56	18	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Mye sår	Autolyserte innvoller
57	18	15 °C	A2	hunn	Gule?	+++	+	Ok	Ok
58	18	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	-	-
59	19	15 °C	A2	?	Feit gul	+++	-	-	-
60	19	15 °C	A2	?	iv	-	-	-	-
61	19	15 °C	A1	?	Gul/Grønn	+/+	+/-	-	-
62	19	15 °C	A1	?	Gul/Grønn	+/+	-/-	-	-
63	19	15 °C	A1	?	Iv (frys)	-	-	Ok	Blodig ascites
64	20	15 °C	A1	hann	Iv (frys)	-	-	Ok	Væske tarm
65	20	15 °C	A1	hann	Iv (frys)	-	-	Sår hode	Svullen milt
66	20	15 °C	A1	hann	Iv (frys)	-	-	Ok	Oppløst inni
67	20	15 °C	A1	hunn	Iv (frys)	-	-	sår siden, rød i hode	Oppløst inni
68	20	15 °C	A1	hunn	Gul (frys)	+	+	Rød i hodereg	Væske tarm, oppløst lever
69	20	9 °C	A1	hunn	Iv (frys)	-	-	Ok	Ok
70	20	9 °C	A1	hunn	Iv (frys)	-	-	Ok	Autolysert lever
71	20	9 °C	A1	hunn	Gul (frys)	+	+	Ok	Autolysert lever
72	20	12 °C	K	hunn	Iv (frys)	-	-	Rød buk	Rød tarm
73	20	12 °C	K	hunn	Iv (frys)	-	-	Ok	Rød tarm
74	20	12 °C	K	hann	Iv (frys)	-	-	Ok	Rød tarm
75	21	15 °C	A2	hann	Feit Gul	+++	-	Ok	Væske tarm
76	22	9 °C	K	hunn	Iv	-	-	snutesår	OK
77	22	15 °C	A2	hann	Gul	+++	+	Sår hode og siden. Blødn brystfinnebasis	Ok
78	22	9 °C	A1	hann	Gul	+++	+	Blødn. hode	Blødn lever
79	22	9 °C	A2	hunn	Iv	-	-	Blødn hode og brystfinnebasis	Væske tarm, svullen milt
80	22	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Ok	Svullen milt
81	22	12 °C	K	hunn	Iv	-	-	Blødn hale	Svullen milt
82	23	9 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Stort sår siden	Autolysert lever
83	23	15 °C	A1	hunn	Feit Gul	++	-	Sår halerot, hode, gatt	Blødn gonade

Tabell C2, forts. Patologi hos døde fisk fra forsøk 2

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
84	23	12 °C	K	hunn	Feit gul	++	-	Stort sår i siden	Væske buk, hoven milt
85	23	15 °C	K	Hann?	iv	-	-	Ok	Væske tarm
86	23	12 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Blødn hode	Autolyserte innvoller
87	23	12 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Blødn hode	Autolyserte innvoller
88	24	15 °C	K	hunn	iv	-	-	Ok	Ok
89	24	15 °C	K	hunn	iv	-	-	Ok	Hoven milt
90	24	12 °C	K	hunn	iv	-	-	Sår rygg, Blødn hode	Ok
91	24	12 °C	K	hunn	Feit gul	+	-	Sår ryggfinner	Væske tarm, rød gonade
92	24	12 °C	K	hunn	iv	-	-	Blødn hode	Rød rogn
93	24	12 °C	K	hann	iv	-	-	Stort sår i siden	Blodig væske tarm
94	24	15 °C	A1	hunn	Gul	++	+	Sår gatt og side, blødn hode	Væske tarm, svullen milt, rød rogn
95	24	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	-	Ok	Væske tarm
96	24	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	-	Oppspist buk	Ikke organer
97	24	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Sår hale, side, blødn hode	Ascites, autolysert lever
98	24	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Sår buk	Autolyserte innvoller
99	24	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Ok	Innvoller i oppløsn. Råtten
100	25	15 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Sår side, blødn hode	Autolysert lever
101	25	6 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Avspist hode	Svullen milt
102	25	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Blødn hode, sår buk	Ok
103	25	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Blødn hode, bleik fisk	Ascites, Autolyserte innvoller
104	25	9 °C	A2	hunn	Gul	+	+	Stort sår siden	Væske tarm
105	25	9 °C	A1	hunn	Gul	+	+	Ok	Ok
106	25	9 °C	A1	hunn	Gul	+	+	Ok	Autolyserte innvoller
107	25	9 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Blødn hode og hele buken, bleik	Autolyserte innvoller
108	25	15 °C	K	hunn	Grønn	+	-	Blødn buk	Ascites
109	25	12 °C	K	hunn	Gul	+	-	Ok	Blødn indre organer
110	25	12 °C	K	hunn	Feit grønn	++	-	Blødn hode	Ascites
111	25	12 °C	K	hunn	Feit grønn	+++	-	Ok	Blødn indre organer

Tabell C2, forts. Patologi hos døde fisk fra forsøk 2

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	kjønn	Vekst TCBS	Mengde	LP2	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
112	25	12 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Store bittsår	Autolyserte innvoller
113	25	12 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Stort sår rygg, bleik fisk	Ascites
114	26	15 °C	A1	hunn	Gul	+	+	Sår hode og gatt	Væske tarm
115	26	15 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Ok	autolysert lever
116	26	15 °C	A2	hunn	Gul	+	+	Sår brystfinnebasis og halefinne	Indre blødn rogn, tarm, lever
117	26	9 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Stort sår i siden, blødn hode	Væske tarm
118	26	9 °C	A2	hunn	Gul	+++	+	Sår rygg	Svullen milt, væske tarm
119	26	12 °C	A2	hann	iv	-	-	Ok	Rød og væskefylt tarm, svullen milt
120	26	9 °C	A1	hunn	Gul	+++	+	Sår rygg og gatt	Ascites
121	26	12 °C	A1	hann	Gul	+++	-	Stort sår hale	Autolyserte innvoller
122	26	12 °C	A1	Hann	Gul	+++	+	Sår hale	Autolyserte innvoller
123	26	12 °C	A1	Hann	Gul	+	+	Ok	Ok

Tabell C3. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 12 °C, smittet med *Vibrio tapetis* LP2, CECT 4600 og NRP 45.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	TCBS	vekst	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
1	6	CECT	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ascites
2	7	NRP 45	A1	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
3	8	NRP 45	A2	hunn	28	gule	+++	<i>Vibrio</i> sp	Sår snute og gjellelokk	Blødn blindtarm
4	8	NRP 45	A2	hunn	29	gule	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Blødn blindtarm, ascites
5	11	LP2	A1	hunn	8	gule	+++	LP2	Ok	Svullen tarm, hvite kuler i nyre
6	11	LP2	A1	hann	9	gule	+++	<i>V. tapetis</i>	Ok	Ascites
7	12	Kontroll		hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
8	12	Kontroll		hunn	-	iv	-	-	Blødn gjellelokk	Blødn tarm
9	13	CECT	A2	hunn	-	iv	-	-	Blødn brystfinnebasis	Væske tarm
10	13	NRP 45	A2	hann	14	gule	+++	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
11	13	NRP 45	A2	hann	15	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. cycliotrophicus</i>	Ok	Ok
12	13	NRP 45	A2	hunn	16	gule	+	<i>V. tapetis</i>	Ok	Væske tarm
13	13	NRP 45	A2	hunn	17	gule	+++	<i>V. splendidus</i>	Sår brystfinnebasis	Ascites
14	13	LP2	A1	hunn	19	gule	+++	<i>V. tapetis</i>	Sår halefinne	Ascites, svullen milt, væske tarm
15	13	NRP 45	A1	hunn	20	gule	+++	<i>V. splendidus</i>	Ok	Svullen milt, blødn tarm
16	14	LP2	A2	hann	42	gule	+++	<i>V. tapetis</i>	Ok	Svullen milt, ascites
17	14	NRP 45	A2	hann	40/41	gule st/små	+	<i>V. cycliotrophicus/V. splendidus</i>	Ok	Ok
18	15	CECT	A1	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
19	15	CECT	A2	hunn	44/45	gule	++	<i>V. splendidus/V.splendidus</i>	Sår ryggfinne	Mye væske tarm
20	15	NRP 45	A2	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
21	15	NRP 45	A2	hunn	46	gule	+++	<i>V. splendidus</i>	Ok	Ok
22	15	NRP 45	A1	hann	47	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Ok
23	15	NRP 45	A1	hann	48	iv TCBS (v MA)		<i>V. harveyi</i>	Ok	Ok
24	15	Kontroll	A1	hann	49	grønne	+++	<i>Vibrio splendidus</i>	Ok	Ok
25	15	Kontroll	A1	hunn	50	gule	+	<i>Vibrio splendidus</i>	Sår bukfinne	Ok
26	16	LP2	A1	hunn	53	gule	+++	<i>V. tapetis</i>	Ok	Autolyserte innvoller, nyre intakt
27	16	LP2	A1	hann	54	gule	+++	<i>V. sp</i> (dårlig sekvens)	Ok	Ascites
28	17	Kontroll	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok

Tabell C3 forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 12 °C.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	TCBS	vekst	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
29	17	Kontroll	A2	hann	30	grønne	+	<i>Vibrio splendidus</i>	Ok	Ok
30	17	LP2	A1	hunn	31	gule	+++	<i>V. tapetis</i>	Ok	Ascites, hoven milt, væske tarm
31	17	NRP 45	A1	hann	32/33	gule stor/liten	+ / ++	<i>V. splend/V. ichthyenteri</i>	Ok	Ascites, blødn tarm
32	17	NRP 45	A1	hunn	-	iv	-	-	Blødn brystfinnebasis	Hvite kuler i nyren
33	17	NRP 45	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Svullen milt
34	18	NRP 45	A1	hann	62/63	gul/grønn	++	<i>V. ichthyenteri</i>	Sår ryggfinne og gatt	Væske tarm
35	18	NRP 45	A1	hunn	64	gule	+++	<i>V. sp</i>	Ok	Ascites
36	18	NRP 45	A1	hunn	65	gule	+	<i>Vibrio splendidus</i>	Ok	Hvite kuler i nyren
37	18	CECT	A1	hann	69	store gule	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ascites
38	18	Kontroll	A2	hunn	71	grønne	++	<i>Vibrio splendius</i>	Ok	Gult, seigt tarminnhold
39	20	Kontroll	A2	hunn	75	lv TCBS	+	<i>Vibrio splendius</i>	Ok	Gult, seigt tarminnhold
40	20	Kontroll	A2	hann	76	gulgrønne	+	<i>V. sp</i>	Ok	Gult, seigt tarminnhold
41	20	Kontroll	A2	hunn	77/78	gul/grønn	+	<i>Marinebacterium/V. splend</i>	Ok	Gult, seigt tarminnhold
42	19	LP2	A1	hunn	79	gule	+++	<i>V. sp</i>	Sår buk og siden	Svullen milt, ascites
43	19	CECT	A1	hunn	-	Ikke prøve	-	-	Autolysert fisk	-
44	19	NRP 45	A2	hunn	80	gulgrønne	+	<i>V. sp</i>	Ok	Rennende nyre
45	19	NRP 45	A2	hunn	-	iv	-	-	Autolysert fisk	-
46	19	NRP 45	A2	hunn	81	grønne	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
47	19	NRP 45	A2	hunn	-	iv	-	-	Ok	Hvite kuler i nyre
48	20	NRP 45	A2	hann	89	gule	+	<i>V. sp</i>	Ok	Hvite kuler i nyre
49	20	NRP 45	A2	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
50	20	NRP 45	A2	hann	91	gule	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
51	20	NRP 45	A2	hunn	92	gule	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
52	20	NRP 45	A2	hunn	93/94	gule st/små	+ / ++	<i>V. sp</i>	Sår	Ok
53	20	NRP 45	A2	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
54	20	Kontroll	A1	hunn	103	gule	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Blødn. tarm
55	20	Kontroll	A1	hann	104	gule	+	<i>V. cycliothrophicus</i>	Ok	Ok
56	20	Kontroll	A1	hunn	105	gule	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Gult, seigt tarminnhold

Tabell C3, fortsettelse. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 12 °C.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	TCBS	vekst	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
57	20	Kontroll	A2	hann	106	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Ok
58	20	Kontroll	A2	hann	107	iv TCBS(v MA)	+	Usikker, dårlig sekv	Ok	Ok
59	20	Kontroll	A2	hunn	108	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Ok
60	20	Kontroll	A2	hunn	109	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. ichtyoenteri</i>	Ok	Ok
61	21	NRP 45	A1	hann	95	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
*63	21	NRP 45	A2	hunn	96	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Ok
64	21	NRP 45	A2	hunn	97	gule	+++	<i>V. splendidus</i>	Sår i siden	Blodig ascites
65	21	NRP 45	A2	hunn	98	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. ichtyoenteri</i>	Ok	Blodig ascites
66	21	CECT	A1	hunn	99	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
67	21	CECT	A1	hunn	100	gule	+++	<i>V. sp</i>	Ok	Blodig ascites
68	21	Kontroll	A1	hunn	101	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Rød tarm
69	21	Kontroll	A1	hann	102	iv TCBS(v MA)	+	<i>V. splendidus</i>	Ok	Rød tarm

*nr. 62 utgått

Tabell C4. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C, smittet med *Vibrio tapetis* LP2, CECT 4600 og NRP 45

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
1	A	4	LP2	A1	hunn	1	gul	+++	LP2	Ok	Ascites
2	B	4	NRP45	A1	hann	2	stor gul	++	V. sp	Ok	Ascites, svart lever, rød tarm
3	1	5	LP2	A2	hunn	4	gul	+++	LP2	Ok	Rød lever, rød rogn
4	2	5	LP2	A2	hunn	5	gul	+++	LP2	mangler øyne	Ok
5	3	5	LP2	A1	hunn	6	gul	+++	LP2	blodutredelser hode ved gjelle	Ok
6	4	5	LP2	A1	hunn	7	gul	+++	LP2	Ok	autolysert lever, kuler i nyre
7	5	5	LP2	A1	hunn	8	gul	+++	LP2	Ok	Ascites
8	6	5	LP2	A1	hunn	9	gul	+++	LP2	Blod gatt, blodutr gjelock	Ascites
9	7	6	LP2	A1	hunn	-	iv	-	-	Svimer, avlivet, blod gatt	Ok
10	8	6	LP2	A1	hunn	10	gul	+++	LP2	Blødn. gjellelock	Ascites blødn gonade, hoven milt
11	9	6	LP2	A2	hunn	11	gul	+++	LP2	Sår, råttten halefinne	Autolysert lever
12	10	6	LP2	A2	hunn	12	gul	+++	LP2	Røde gj lokk, rød siden	Ok
13	11	6	K	A1	hunn	13	feit gulgrønn	+++	V. sp	Ok	Ok
14	12	7	K	A1	hunn	14/15	gul/grønn	++/++	V. sp/V. sp	Ok	Ok
15	13	7	K	A2	hunn	-	iv	-	-	Rødt gatt	Væske tarm
16	14	7	K	A2	hunn	16	gul	+	V. sp	Ok	Rød lever
17	15	7	LP2	A2	hunn	17	gul	+++	LP2	Rød gatt	Svullen milt, væske tarm
18	16	7	LP2	A2	hann	18	gul	+++	LP2	Rød kjeve og finnebas.	Svullen milt,
19	17	7	LP2	A2	hunn	19	gul	+++	LP2	Bleik	Ok
20	18	7	LP2	A2	hunn	20	gul	+++	LP2	Sår gatt	Svullen milt
21	19	8	K	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
22	20	8	K	A2	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
23	21	8	LP2	A1	sekundær	21	gul	+++	LP2	Sår hode og siden, rød brfinnebas	Ascites, autolysert lever
24	22	8	LP2	A2	hann	22	gul	+++	LP2	Ok	Autolysert lever, svullen milt
25	23	8	LP2	A2	hunn	23	gul	+++	LP2	Ok	Autolysert lever
26	24	8	LP2	A2	hunn	24	gul	+++	LP2	Rød gatt bittskader	Ascites
27	25	9	K	A1	hann	-	iv	-	-	Ok	Rød lever, væske tarm
28	26	9	NRP45	A2	hunn	-	iv	-	-	Rød snute	Rød tarm, svullen milt

Tabell C4, forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
29	27	9	CECT4600	A2	hunn	-	iv	-	-	Sår gatt	Hoven milt, væske tarm
30	28	9	LP2	A1	hunn	25	gul	+++	LP2	Ok	Væske tarm, svullen milt
31	29	9	LP2	A2	hunn	26	gul	+++	LP2	Bleik	Autolysert lever, væske tarm
32	30	10	K	A2	hunn	27/28	gul feit/grønn	++/++	V. sp/V. sp	Røde gjellelokk	Autolysert lever
33	31	10	CECT4600	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Rød lever, svullen milt
34	32	10	CECT4600	A2	hunn	29/30	gul feit/grønn	++/++	V. sp/V. sp	Røde gjellelokk	Autolyserte innvoller (nyre inntakt)
35	33	10	LP2	A2	hunn	31	gul	+++	LP2	Bleik	Ok
36	34	10	LP2	A1	hunn	32	gul	+++	LP2	Rødt gatt	Væske tarm, svullen milt
37	35	10	LP2	A1	hann	33	gul	+++	LP2	Bleik	Ascites, autolysert lever
38	36	11	K	A1	hunn	-	iv	-	-	Rødt gatt	Rød lever
39	37	11	LP2	A2	hunn	-	ikke prøve	-	-	Bleik, ødelagt fisk	Autolyserte innvoller, Ikke prøve
40	38	11	LP2	A2	hunn	-	iv	-	-	Sår gatt	Ok
41	39	11	LP2	A1	hunn	34	gul	+++	LP2	Sår gatt	Ascites, autolysert lever, svullen milt
42	40	11	CECT4600	A1	hunn	-	iv	-	-	Rød buk, bleik fisk	Autolysert lever
43	41	11	CECT4600	A1	hunn	35	feit gul	+	V.sp	Ok	Ok
44	42	11	CECT4600	A2	hunn	36/37	fet gul/grønn	+++/+++	V. sp/V. sp	Bleik	Væske tarm
45	43	11	CECT4600	A2	hunn	38/39	fet gul/grønn	+++/++	V. sp/V. sp	Bleik	Væske i tarm
46	44	11	CECT4600	A2	hunn	40/41	fet gul/grønn	+++/++	V. sp/V. sp	Bleik	Væske tarm, bleik
47	45	12	NRP45	A2	hann	42	gul	+++	V. sp	Ok	Ascites
48	46	12	NRP45	A1	hunn	43	fet grønn	+++	V. sp	Røde gjellelokk	Ok
49	47	12	NRP45	A1	hunn	44	fet gulgrønn	+++	V. sp	Bleik, bittsår hode	Ascites
50	48	12	CECT4600	A2	hann	45	gul	+++	V. sp	Ok	Ascites, svullen milt
51	49	12	LP2	A1	hann	46	gul	+	LP2	Ok	Autolysert lever (foto)
52	50	12	LP2	A2	hunn	47	gul	+++	LP2	Bleik	Ascites, autolysert lever
53	51	13	K	A1	hunn	48	gulgrønn	+++	V. sp	Røde gjellelokk	Rød lever, væske tarm
54	52	13	K	A2	hunn	49	gulgrønn	+	V. sp	Røde gjellelokk,sår snute	Væske tarm
55	53	13	CECT4600	A2	hunn	50	gulgrønn	+++	V.sp	Ok	Rød lever
56	54	13	CECT4600	A2	hunn	51	gulgrønn	++	V.sp	Rødt hode og gatt	Autolysert lever, væske i tarm
57	55	13	LP2	A2	hann	-	iv	-	-	Ok	Svullen milt, væske tarm

Tabell C4, forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
58	56	13	LP2	A2	hunn	53	gul	+	LP2	Sår hale	Rød lever
59	57	13	NRP45	A1	hunn	54/55	gul store/små	++/++	<i>V. ichthyenteri/V. sp</i>	Bleik	Autolyserte innvoller
60	58	13	NRP45	A1	hunn	56/57	gul stor/grønn	+++/+	<i>V. sp/V. sp</i>	Bleik	Bleik inni
61	59	13	NRP45	A1	hunn	58/59	grønn store/små	+++/>++	<i>V. sp/V. sp</i>	Bleik	Autolysert lever, hoven milt
62	60	13	NRP45	A1	hunn	60	grønn	+++	<i>V. sp</i>	Sår gatt, røde gjellelokk	Autolysert lever
63	61	13	NRP45	A1	hunn	61	grønn	+++	<i>V. sp</i>	Røde gjellelokk	Autolysert lever
64	62	13	NRP45	A1	hunn	62	fet gulgrønn	+++	<i>V. splendidus</i>	Røde gjellelokk	Ascites, autolyserte innvoller
65	63	14	CECT4600	A1	hunn	63	gul	+++	<i>V. sp</i>	Sår gatt	Ok
66	64	14	CECT4600	A1	hunn	64	gul	+++	<i>V. sp</i>	Sår gatt	Ok
67	65	14	CECT4600	A2	hunn	65/66	gul/grønn	+++/>+++	<i>V. sp/V. sp</i>	Rød v/ brystfinnebasis	Ok
68	66	14	NRP45	A1	hunn	67	gulgrønn	+++	<i>V. sp</i>	Ok	Autolyserte innvoller
69	67	14	NRP45	A1	hunn	68	gulgrønn	+++	<i>V. sp</i>	Sår	Autolyserte innvoller
70	68	14	NRP45	A1	hunn	69/70	gul feit/grønn	+++/>+++	<i>V. sp/V. sp</i>	Sår	Ok
71	69	14	NRP45	A1	hunn	71	gulgrønn	+++	<i>V. sp</i>	Sår	Ok
72	70	14	NRP45	A1	hunn	72/73	hvit /fet gul	+/>+	<i>V. sp/V. sp</i>	Sår	Ok
73	71	14	NRP45	A1	hunn	74	fet gul	+++	<i>V. sp</i>	Mørke gjellelokk	Autolyserte innvoller
74	72	14	NRP45	A1	hunn	74b	grønn	+++	<i>V. sp</i>	Røde gjellelokk	Autolyserte innvoller
75	73	14	NRP45	A2	hunn	75/76	grønn/feit gul	+/>+	<i>V. sp/V. sp</i>	Rød gj.lokk og brystf.basis	Ok
76	74	14	NRP45	A2	hunn	77	gul	+++	<i>V. tapetis</i>	Sår hode, røde gjellelokk	Ok
77	75	14	K	A1	hunn	78	gulgrønn	+	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
78	76	14	K	A1	hunn	79/80	grønn/feit gul	+++/>+	<i>V. sp/V. sp</i>	Sår gatt, skadde finner	Ok
79	77	14	K	A1	hunn	-	iv	-	-	Sår gatt, skadde finner	Ok
80	78	14	K	A2	hunn	81	grønn	+++	<i>V. sp</i>	Sår gatt	Ok
81	79	15	CECT4600	A1	hunn	82	gul	+++	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
82	80	15	CECT4600	A2	hunn?	83	gulgrønn	+++	<i>V. sp</i>	Ok	Ok
83	81	15	CECT4600	A2	hunn	84/85	gul/grønn	+++/>+++	<i>V. sp</i>	Ok	Autolyserte innvoller
84	82	15	LP2	A1	hann	86	gul	+++	LP2	Store sår	Ok

Tabell C4, forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
85	83	15	LP2	A2	hunn	83	gul	+++	LP2	Ok	Ok
86	84	15	NRP45	A1	hunn	88	gulgrønn	+++	V. sp	Ok	Ok
87	85	15	K	A1	hunn?	89/90	gul/grønn	++/++	V.sp/V.sp	Ok	Ok
88	86	16	CECT4600	A2	hann	91/92	gul/grønn	+++/+++	V. sp/V. sp	Ok	Ok
89	87	16	CECT4600	A2	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
90	88	16	CECT4600	A2	hunn	93	grønn	++	V. sp	Ok	Ok
91	89	16	CECT4600	A2	hunn	94/95	gul /grønn	+/+	V. sp/V. sp	Ok	Ok
92	90	16	CECT4600	A2	hunn	96	gulgrønn	++	V. sp	Ok	Autolyserte innvoller
93	91	16	CECT4600	A2	hunn	97	grønn	+	V. sp	Ok	Autolysert lever
94	92	16	LP2	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
95	93	16	LP2	A1	hunn	98	gul	+++	V. sp	Ok	Ok
96	94	16	NRP45	A2	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
97	95	16	NRP45	A2	hunn	99	gul	+	V. sp	Ok	Ok
98	96	16	K	A1	hunn	100	fet gulgrønn	+++	V. sp	Ok	Ok
99	97	16	K	A1	hunn	101/102	fet gul/grønn	+/+	V. sp/V. sp	Ok	Ok
100	98	16	K	A1	hann	103	gul	+++	V. sp/V. sp	Ok	Ok
101	99	16	K	A2	hunn	104	fet gulgrønn	+++	V. sp	Ok	Ok
102	100	16	NRP45	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
103	101	16	NRP45	A2	hann	-	iv	-	-	Sår ryggfinne	Ok
104	102	17	CECT4600	A1	hunn	105	gul	+	V. tapetis	Rød v brystfinne	Ok
105	103	17	CECT4600	A2	hunn	106/107	gul/grønn	++/++	V. sp/V.sp	Ok	Ok
106	104	17	CECT4600	A2	hunn	108	grønn	+	V. sp	Ok	Ok
107	105	17	CECT4600	A2	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
108	106	17	CECT4600	A2	hunn	109	gul	+++	V. sp	Ok	Ok
109	107	17	CECT4600	A2	hunn	110	gul	+	V. splendidus	Ok	Ok
110	108	17	LP2	A2	hunn	111	grønn	+++	V. sp	Ok	Ok
111	109	17	NRP45	A1	hunn	113	gul	+++	V. sp	Ok	Ascites
112	110	17	NRP45	A2	hann	114/115	gul/grønn	++/++	V. sp/V. sp	Ok	Ok

Tabell C4, forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
113	111	17	K	A1	hunn	116	fet gulgrønn	+++	V. sp	Sår rygg og finnebasis	Ok
114	112	17	NRP45	A1	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
115	113	17	NRP45	A1	hunn	123/124	gul/grønn	++/+	V. sp/V. sp	Ok	Ok
116	114	17	NRP45	A1	hunn	125/126	gul/grønn	+++/>+++	V. sp/V. sp	Ok	Ok
117	115	18	K	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ok
118	116	18	CECT4600	A1	hunn	117	gul	+++	V. tapetis	Rød i hode	Autolyserte innvoller
119	117	18	CECT4600	A1	hunn	118/119	gul/grønn	+++/>+++	V. sp/V. sp	Rød i hode	Ok
120	118	18	CECT4600	A1	hunn	120	fet gulgrønn	+++	V. sp	Rød i hode	Ascites
121	119	18	CECT4600	A2	hunn	121	gulgrønn	++	V. sp	Sår halefinnebasis	Ok
122	120	18	CECT4600	A2	hunn	122	grønn	+	V. sp	Ok	Indre blødn
123	121	18	NRP45	A1	hann	127	gul	+++	V. sp	Sår	Autolysert lever
124	122	18	NRP45	A1	hann	128	fet gulgrønn	+++	V. sp	Ok	Ok
125	123	18	NRP45	A2	hunn	129/130	grønn	++	V. sp	Rødt gatt, brystfinnebas, gjlokk	Ok
126	124	18	NRP45	A2	hann	131	gul	+++	V. sp	Sår på siden	Ok
127	125	18	NRP45	A2	hunn	132	grønn	+++	V. sp	Ok	Ok
128	126	19	K	A1	hunn	-	iv	-	-	Ok	Ascites
129	127	19	K	A1	hann	133	grønn	++	V. sp	Ok	Ascites
130	128	19	K	A1	hunn	134	grønn	++	V. sp	Rød i hode	Ascites
131	129	19	K	A2	hunn	135	fet gul	+++	V. sp	Røde gjellelokk	Ascites, røde innvoller
132	130	19	K	A2	hunn	136	fet gul	+++	V. sp	Rød brystfinnebasis, avspist hale	Ascites, røde innvoller
133	131	19	K	A2	hunn	137	gul	+++	V. sp	Sår gatt	Ascites, røde innvoller
134	132	19	CECT4600	A1	hann	138	gul	+++	V. sp	Bleik	Ok
135	133	19	CECT4600	A1	hunn	139	gul	+	V. sp	Sår gatt, brystfinnebasis	Ok
136	134	19	CECT4600	A1	hunn	140/141	gulgrønn	+++	V. sp	Sår hale og gatt	Ok
137	135	19	CECT4600	A1	hunn	142	gul	+++	V. splendidus	Sår gatt, bleik	Autolyserte innvoller
138	136	19	CECT4600	A2	hunn	143	grønn	+	V. sp	Blødn hode, hale. Bleik	Svullen milt
139	137	19	CECT4600	A2	hunn	144	grønn	+	V. sp	Blødn hode, bleik	Svullen milt
140	138	19	CECT4600	A2	hunn	145	grønn	+	V. sp	Blødn hode	Autolyserte innvoller

Tabell C4, forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
141	139	19	CECT4600	A2	hunn	146	grønn	+++	V. sp	Ok	Autolyserte innvoller
142	140	19	CECT4600	A2	hann	147/148	gul/grønn	+++/+	V, sp/V. sp	Ok	Autolyserte innvoller
143	141	19	LP2	A1	hunn	148/150	gulstor/liten	++/++	V, sp/V. sp	Bleik	Ascites, røde innvoller
144	142	19	LP2	A2	hunn	151	gul	+++	LP2	Blødn hode	Autolyserte innvoller
145	143	19	LP2	A2	hann	152	gul	+++	LP2	Bleik, sår	Autolyserte innvoller
146	144	19	LP2	A2	hunn	154	gul	+++	LP2	Bleik, sår	Autolyserte innvoller
147	145	19	NRP45	A2	hann	155	gul	+	V. sp	Blødn ryggfinne og snute	Ascites, autolyserte innvoller
148	146	19	NRP45	A2	hunn	156/157	gul/grønn	+/+	V, sp/V. sp	Rødt gatt	Røde innvoller
149	147	20	K	A1	hunn	-	ikke prøve	-	-	Rødt gatt, rød halefinne	Ok
150	148	20	K	A1	hunn	158/158	grønn/gul	+++/>+++	V, sp/V. sp	Rødt gatt, rødt gjellelokk	Ascites
151	149	20	K	A2	hunn	160	gul	+++	V. sp	Bleik	Autolyserte innvoller
152	150	20	K	A2	hunn	161/162	grønn/gul	+++/>+++	V, sp/V. sp	Rødt gatt	Ascites
153	151	20	K	A2	hunn	163/164	blank/gul	+++/>+++	V, sp/V. sp	Rødt gatt og gjellelokk	Ascites
154	152	20	CECT4600	A1	hunn	165	gulgrønn	+++	V. sp	Bleik, blødn brystfinnebais	Ok
155	153	20	CECT4600	A1	hunn	166	gul	+++	<i>V. tapetis</i>	Bleik	Ascites
156	154	20	CECT4600	A2	hann	167	gul	++	V. sp	Bleik, rød brystfinnebais, bittskader	
157	155	20	CECT4600	A2	hunn	168	fet gulgrønn	+++	V. sp	Bleik, rød brystfinnebais bittsakader	
158	156	20	CECT4600	A2	hunn	169	gul	+	V. sp	Bleik, rød brystfinnebais, rødt gatt	Ok
159	157	20	CECT4600	A2	hunn	170/171	grønn	+	V. sp	Rød brystfinnebais, avspist hale	Ok
160	158	20	CECT4600	A2	hunn	172/173	fet gulgrønn/grønn	++/++	V, sp/V. sp	Rød brystfinnebas, rød flisete halef	Ok
161	159	20	NRP45	A2	hunn	174/175	gul/grønn	++/++	V, sp/V. sp	Ok	Autolyserte innvoller
162	160	20	LP2	A1	hunn	-	iv	-	-	Rødt gatt, ødelagt halefinne	Ok
163	161	20	LP2	A1	hunn	176	gul	+++	LP2	Avspist halefinne	Ok
164	162	20	LP2	A2	hann	177	gul	+	V. sp	Bleik, bittsår rygg	Ok
165	163	20	LP2	A2	hann	178	gul	+++	V. sp	Slitt halefinne	Ok
166	164	21	CECT4600	A1	hann	179	gul	+++	<i>V. tapetis</i>	Ok	Ok
167	165	21	CECT4600	A1	hunn	181	gul	+++	<i>V. splendidus</i>	Ok	Ok
168	166	21	CECT4600	A1	hunn	183	gul	+++	V. sp	Sår v /ryggfinne og i siden	Ok

Tabell C4, forts. Patologi hos døde fisk i forsøk 3, 15 °C

Antall fisk	Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Kjønn	Isolat Nr	Vekst TCBS	Mengde	Bakterie	Ytre observasjoner	Indre observasjoner
169	167	21	CECT4600	A1	hann	184	grønn	+++	V. sp	Sår ryggfinne	Ok
170	168	21	CECT4600	A1	hann	185	gul	+	V. tapetis	Ok	Ok
171	169	21	CECT4600	A1	hann	186	gul	+	V. tapetis	Sår ryggfinne	Ok
172	170	21	LP2	A1	hunn	187	gul	+++	V. tapetis	Ok	Ok
173	171	21	LP2	A1	hunn	188	gul	+++	V. tapetis	Ok	Ok
174	172	21	NRP45	A1	hann	-	iv	-	-	Ok	Ok
175	173	21	NRP45	A1	hann	189	grønn	+++	V. sp	Ok	Ok
176	174	21	NRP45	A1	hunn	190/191	grønn1/2	+++/+++	V, sp/V. sp	Ok	Ok
177	175	21	NRP45	A2	hunn	192/193	gul stor/små	++/++	V, sp/V. sp	Ok	Ok
178	176	21	NRP45	A2	hunn	194/195	gul/grønn	++/++	V. tapetis/ V. sp	Ok	Ok
179	177	21	K	A1	hann	196	blank/gul	++	V, sp/V. sp	Sår ryggfinne	Ok
180	178	21	K	A1	hunn	197/198	gul/grønn	++/++	V, sp/V. sp	Ok	Ok
181	179	21	K	A2	hann	199	gul	+++	V. sp	Ok	Ok
182	180	21	K	A2	hunn	200/201	blank/gul	++/++	V, sp/V. sp	Ok	Ok
183	181	21	K	A2	hunn	202/203	blank/grønn	+++/+++	V, sp/V. sp	Sår i siden	Ok
184	182	21	K	A2	hunn	204 - 206	tre forskj	-	3 V. spp	Sår gatt	Ok
185	183	21	K	A2	hunn	207 - 209	tre forskj	-	3 V. spp	Ok	Ok
186	184	21	K	A2	hann	210	gul	+++	V. sp	Sår ryggfinne	Ok

Vedlegg D. Rådata for grafer og tabeller

Verdier til vekstkurvene

Tabell D1. Verdier for vekstkurve for *Vibrio tapetis* LP2.

Tid (timer etter oppstart)	Absorpsjon (A600)	Antall bakterier ved utplating på MA
6	0,05	
8	0,13	
9	0,14	
10	0,15	
11	0,165	
11,5	0,195	$4,6 \times 10^7$
12	0,28	
12,5	0,310	$3,3 \times 10^7$
13	0,438	
13,5	0,506	$5,6 \times 10^7$
14	0,674	
14,5	0,766	$8,0 \times 10^7$
15	0,911	
15,5	1,118	$1,1 \times 10^8$
16	1,290	
16,5	1,488	$6,3 \times 10^7$
17	1,683	
17,5	1,787	
18	1,848	
18,5	1,907	$5,1 \times 10^8$
19	1,912	
19,5	1,905	
20	1,912	

Tabell D2. Verdier for vekstkurve for NRP45.

Tid (timer etter oppstart)	Absorpsjon (A600)	Antall bakterier ved utplating på MA
6	0,113	
8	0,201	
9	0,222	$3,0 \times 10^7$
10	0,475	
11	0,705	$9,2 \times 10^7$
11,5	0,854	
12	1,016	$2,0 \times 10^8$
12,5	1,259	
13	1,512	$2,2 \times 10^8$
13,5	1,644	
14	1,728	$4,4 \times 10^8$
14,5	1,875	
15	1,913	
15,5	1,919	
16	1,644	
16,5	1,901	$6,5 \times 10^8$
17	1,93	
17,5	1,917	
18	1,924	
18,5	1,94	
19	1,912	

Tabell D3. Verdier for vekstkurve for *Vibrio tapetis* CECT4600

Tid (timer etter oppstart)	Absorpsjon (A600)	Antall bakterier ved utplating på MA
6	0,040	
8	0,040	
9	0,076	
10	0,127	$1,0 \times 10^7$
11	0,236	
11,5	0,301	
12	0,361	$2,6 \times 10^7$
12,5	0,472	
13	0,632	$2,8 \times 10^7$
13,5	0,706	
14	0,848	
14,5	1,123	$1,1 \times 10^8$
15	1,227	
15,5	1,379	
16	1,594	$1,3 \times 10^8$
16,5	1,737	
17	1,876	
17,5	1,939	
18	1,989	$3,7 \times 10^7$
18,5	2,046	
19	2,004	

Vekt, lengde og kjønn hos fisk benyttet i forsøkene

Tabell D4. Gjennomsnittsvekt (gram) og - lengde (cm) til overlevende og døde fisk i forsøk 1, totalt og fordelt på kjønn.

	Totalt			Hanner			Hunner		
	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde
Antall fisk	162**	130*	32(20 %)	82	70	11 (13 %)	60	40	21 (35 %)
Vekt	41,1	39,4	45,5	43	41,7	62,5	36,5	34,9	36,5
Lengde	12,6	12,5	12,6	12,8	12,6	13,4	13	12,3	12,2

* Av de overlevende fiskene var to bergnebb og en sekundærhann. ** Kun 8 fisk i hver av kontrollgruppene ble veid, målt og kjønnsbestemt. Det mangler derfor 10 fisk i gruppe KB og 11 fisk i gruppe KS, som ikke er registrert under hanner eller hunner, men går inn i totaltallet.

Tabell D5. Gjennomsnittsvekt (gram) og - lengde (cm) til overlevende og døde fisk i forsøk 2, totalt og fordelt på kjønn.

	Totalt			Hanner			Hunner		
	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde
Antall fisk	480	358*	122**(25%)	141	123	36 (29%)	324	275	86 (31%)
Vekt	37,3	37,1	39,0	49,7	51,1	50,5	29,6	30,6	28,3
Lengde	13,3	13,5	11,8	14	15,1	12,9	12,4	12,8	11

* Av de overlevende fiskene var 7 sekundærhanner. ** Av de døde fiskene var 3 sekundærhanner. Fem døde fisk ble ikke veid, målt eller kjønnsbestemt. Disse fiskene er ikke registrert under hanner eller hunner, men går inn i totaltallet.

Tabell D6. Gjennomsnittsvekt (gram) og - lengde (cm) til overlevende og døde fisk i forsøk 3, 12 °C, totalt og fordelt på kjønn.

12 °C	Totalt			Hanner			Hunner		
	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde
Antall fisk	404	336*	68(17%)	215	191	24(11%)	186	142	44(24%)
Vekt	48,9	51,9	33,9	49,3	60,7	37,2	36,2	40,4	32,2
Lengde	14,9	15,3	12,8	15,3	16,2	13,2	13,5	14,2	12,5

* Av de overlevende fiskene var to sekundærhanner og en bergnebb. Disse fiskene er kun regnet med i totalantall fisk, og er ikke registrert under kjønn eller beregnet med i målinger av gjennomsnitt for lengde og vekt.

Tabell D7. Gjennomsnittsvekt (gram) og - lengde (cm) til overlevende og døde fisk i forsøk 3, 15 °C, totalt og fordelt på kjønn.

15 °C	Totalt			Hanner			Hunner		
	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde	Alle	Overlevende	Døde
Antall fisk	481	295**	186**(39%)	237	202	39(16%)	238	90	146(61%)
Vekt	35,2	35,5	35,2	40,3	39,2	41,3	30,1	26,5	33,7
Lengde	13,7	14,3	13,7	14,5	14,6	14,4	13,3	13,0	13,6

* Av de overlevende fiskene var en bergnebb, en gressgylt og en sekundærhann. ** Av de døde fiskene var tre sekundærhanner. Disse fiskene er kun regnet med i totalantall fisk, og er ikke registrert under kjønn eller beregnet med i målinger av gjennomsnitt for lengde og vekt.

Rådata for tabellene side 101

Forsøk 1

Døde fisk

Tabell D8. Viser vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 1. Følgende forkortelser er benyttet i kolonnen "gruppe": H = høy, D = dose, B = bad og S = stikk.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
1	2	HDB	54,0	15,0	hunn
2	5	MDS	32,4	10,5	hunn
3	5	MDS	49,9	12,5	hunn
4	6	MDS	39,1	12,2	hunn
5	7	LDS	11,5	23,0	hunn
6	8	LDS	35,6	12,0	hunn
7	8	LDS	113,8	17,0	hann
8	9	MDS	77,9	14,5	hann
9	10	MDS	44,6	11,2	hunn
10	11	MDB	37,8	11,5	hunn
11	12	HDB	60,1	13,5	hann
12	14	HDB	60,4	12,5	hann
13	14	HDS	75,9	14,3	hann
14	14	MDS	34,0	12,0	hunn
15	15	MDS	32,6	11,0	hunn
16	16	KB	39,4	12,7	hunn
17	18	HDB	36,7	11,5	hann
18	18	HDB	26,4	10,5	hunn
19	18	HDS	35,2	10,9	hunn
20	18	HDS	50,0	12,5	hunn
21	20	HDS	34,4	11,1	hunn
22	20	KB	48,7	12,5	hunn
23	20	HDB	35,3	11,5	hunn
24	22	HDS	53,6	13,0	hann
25	26	KS	48,5	13,0	hunn
26	27	KS	29,7	11,0	hunn
27	27	HDS	35,3	11,0	hann
28	28	KS	25,7	10,5	hunn
29	29	LDS	96,0	15,0	hann
30	33	LDB	34,0	11,5	hann
31	33	HDB	22,2	10,0	hunn
32	33	HDS	44,0	13,0	hann
Gjennomsnitt			45,5	12,6	

Overlevende fisk

Tabell D9. Viser vekt (gram), lengde (centimeter) og kjønn hos de overlevende fiskene i forsøk 1. Her ble kun 8 av de døde fiskene i kontrollgruppene veid, målt og kjønnsbestemt. Følgende forkortelser er benyttet i kolonnen "Gruppe": H = høy, M = Medium, L = Lav, D = dose, B = bad og S = stikk.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
1	1	HDB	28,5	10,5	hann
2	2		30,1	11,0	hann
3	3		43,9	12,5	hann
4	4		28,8	10,0	hann
5	5		56,2	13,0	hann
6	6		46,3	13,0	hann
7	7		35,0	11,0	hunn
8	8		33,8	12,0	hunn
9	9		22,8	10,5	hunn
10	10		42,7	13,0	hunn
11	11		27,8	11,0	hunn
12	12		52,8	14,0	hunn
13	13		21,3	9,5	hunn
14	1	MDB	38,8	11,5	hann
15	2		22,5	9,5	hann
16	3		24,1	10,0	hann
17	4		43,8	12,5	hann
18	5		36,4	11,0	hann
19	6		50,5	13,0	hann
20	7		30,5	11,0	hann
21	8		56,3	13,0	hann
22	9		38,2	11,2	hann
23	10		39,0	12,2	hann
24	11		43,3	13,0	hann
25	12		43,4	12,5	hann
26	13		33,7	11,5	hann
27	14		65,4	14,0	hann
28	15		52,3	13,5	hann
29	16		46,3	12,5	hann
30	17		33,0	11,5	hunn
31	18		21,4	10,5	hunn
32	19		50,1	13,5	hunn
34	1	LDB	36,4	12,0	hann
35	2		35,4	12,0	hann
36	3		45,0	11,5	hann
37	4		27,8	10,5	hann
38	5		28,8	10,0	hann
39	6		40,5	11,5	hann
40	7		33,4	11,2	hann
41	8		32,8	11,5	hann
42	9		27,1	11,0	hann
43	10		38,7	11,7	hann
44	11		42,9	11,0	hann
45	12		24,6	10,0	hann
46	13		86,4	15,0	hann
47	14		50,9	12,5	hann
48	15		36,8	12,0	hunn
49	16		24,0	10,0	hunn

Tabell D9, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
50	17	LDB	26,2	10,5	hunn
51	18		29,0	11,0	hunn
52	19		21,4	10,5	hunn
53	1	KB	28,8	11,0	hunn
54	2		18,8	9,5	hunn
55	3		68,5	13,0	hann
56	4		22,1	10,0	hann
57	5		27,1	10,5	hunn
58	6		58,2	13,5	hann
59	7		38,9	11,3	hunn
60	8		36,6	11,9	hunn
61	1	HDS	24,5	10,0	hann
62	2		39,4	12,0	hann
63	3		41,0	12,0	hann
64	4		45,4	15,4	hann
65	5		38,7	13,4	hann
66	6		26,7	13,0	hann
67	7		21,9	12,7	hann
68	8		24,5	10,0	hunn
69	9		65,0	14,5	hunn
70	10		38,1	14,5	hunn
71	11		26,3	13,9	hunn
72	12		25,6	12,7	hunn
73	13		51,0	15,5	hunn
74	14				bergnebb
75	1	MDS	70,7	17,9	hann
76	2		30,1	12,7	hann
77	3		35,3	13,9	hann
78	4		34,2	14,5	hann
79	5		33,6	13,3	hann
80	6		36,6	12,9	hann
81	7		29,6	13,6	hann
82	8		29,1	11,9	hann
83	9		39,5	14,0	hann
84	10		74,7	17,9	hann
85	11		27,7	12,2	hann
86	12		74,7	17,6	hann
87	13				bergnebb
88	14		25,2	12,7	hunn
89	1	LDS	48,7	4,9	hann
90	2		37,2	13,6	hann
91	3		44,4	14,9	hann
92	4		81,7	17,4	hann
93	5		45,2	15,2	hann
94	6		56,1	16,4	hann
95	7		57,5	15,5	hann
96	8		47,1	15,5	hann
97	9		28,4	12,8	hann
98	10		42,6	13,4	hann
99	11		29,7	13,9	hunn
100	12		23,7	12,2	hunn
101	13		29,2	12,8	hunn
102	14		29,2	13,4	hunn
103	15		80,0	17,9	hunn
104	16		36,6	11,98	hunn
105	1	KS	31,3	10,5	hann

Tabell D9, fortsettelse.

Fisk nr	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
106	2	KS	48,5	14,0	hunn
107	3		29,7	12,0	hunn
108	4		44,4	13,0	hann
109	5		44,1	12,0	sekundær
110	6		53,9	15,2	hunn
111	7		16,2	10,9	hunn
112	8		78,4	15,0	hunn
Gjennomsnitt			39,4	12,5	

Forsøk 2

Døde fisk

Tabell D10. Vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 2.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
1	6	9 °C	K	? *	13,0	hunn
2	6	12 °C	A1	? *	15,0	hann
3	6	15 °C	A1	? *	9,5	hunn
4	7	15 °C	A1	? *	10,0	hann
5	8	9 °C	A2	52,3	12,5	hunn
6	8	12 °C	A2	53,8	12,5	hann
7	9	15 °C	A1	22,8	10,5	hunn
8	9	12 °C	A1	83,8	15,0	hunn
9	10	12 °C	A1	26,8	10,5	sekundær
10	10	12 °C	A2	34,7	11,0	hunn
11	11	15 °C	A2	33,5	11,0	hunn
12	11	15 °C	A1	22,7	10,0	hunn
13	11	15 °C	A1	47,9	12,0	hunn
14	12	12 °C	K	35,6	11,5	hunn
15	12	15 °C	K	78,0	14,0	hann
16	12	12 °C	A1	44,8	12,0	hann
17	12	12 °C	A1	50,2	13,0	hann
18	12	12 °C	A1	30,5	10,0	hunn
19	12	6 °C	A1	42,6	12,0	hann
20	12	6 °C	K	27,0	10,3	hunn
21	13	9 °C	K	66,5	14,0	hunn
22	13	9 °C	A2	42,5	12,5	hunn
23	13	15 °C	A2	17,2	9,5	hunn
24	13	15 °C	A2	30,9	11,5	hunn
25	13	15 °C	A2	42,4	13,0	hunn
26	13	6 °C	A1	26,4	11,0	hunn
27	13	15 °C	A1	29,2	11,5	hunn
28	13	15 °C	A1	44,1	12,0	hunn
29	13	15 °C	A1	49,4	13,0	hunn
30	13	12 °C	K	40,0	12,0	hunn
31	14	15 °C	A2	43,4	12,0	hunn
32	15	12 °C	K	59,4	14,0	hunn
33	15	12 °C	K	63,0	14,5	hann
34	15	15 °C	A2	35,8	12,0	hann
35	16	12 °C	K	37,6	11,5	hunn
36	16	15 °C	A2	26,4	11,5	hunn
37	16	9 °C	A2	42,2	12,5	hann
38	16	9 °C	A2	57,4	14,0	hann
39	16	9 °C	A2	37,6	11,5	hunn
40	16	12 °C	A1	13,8	9,0	hunn
41	16	9 °C	A1	25,5	11,0	hunn
42	16	9 °C	A1	20,8	9,5	hunn
43	17	9 °C	A2	27,2	10,5	hunn
44	17	15 °C	A1	19,5	10,0	hunn
45	17	12 °C	K	24,9	10,3	hunn
46	17	12 °C	K	33,7	10,3	sekundær
47	17	12 °C	A1	47,3	13,0	hunn
48	17	12 °C	A1	16,4	9,5	sekundær
49	18	6 °C	K	31,8	11,0	hunn
50	18	12 °C	A1	28,1	11,2	hunn

Tabell D10, fortsettelse.

Fisk nr.	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
51	18	12 °C	A1	57,9	14,5	hann
52	18	12 °C	A2	42,4	12,3	hann
53	18	12 °C	A2	26,8	10,5	hunn
54	18	15 °C	A1	39,1	12,0	hann
55	18	15 °C	A1	36,1	12,5	hann
56	18	15 °C	A2	13,0	8,5	hann
57	18	15 °C	A2	23,5	11,0	hunn
58	18	15 °C	A2	? *	? *	? *
59	19	15 °C	A2	? *	? *	? *
60	19	15 °C	A2	? *	? *	? *
61	19	15 °C	A1	? *	? *	? *
62	19	15 °C	A1	? *	? *	? *
63	19	15 °C	A1	30,2	11,0	hunn
64	20	15 °C	A1	107,6	16,0	hunn
65	20	15 °C	A1	39,1	13,0	hann
66	20	15 °C	A1	20,2	9,4	hann
67	20	15 °C	A1	95,0	17,1	hunn
68	20	15 °C	A1	21,8	11,0	hunn
69	20	9 °C	A1	21,0	10,0	hunn
70	20	9 °C	A1	45,2	13,0	hunn
71	20	9 °C	A1	23,4	10,5	hunn
72	20	12 °C	K	39,6	13,0	hunn
73	20	12 °C	K	33,0	11,0	hunn
74	20	12 °C	K	46	13,5	hunn
75	21	15 °C	A2	37,6	12,9	hunn
76	22	9 °C	K	25,4	10,5	hunn
77	22	15 °C	A2	38,2	12,5	hann
78	22	9 °C	A1	63,6	13,5	hann
79	22	9 °C	A2	43	12,5	hunn
80	22	15 °C	A1	23	10,0	hunn
81	22	12 °C	K	30,8	11,5	hunn
82	23	9 °C	A1	25,3	10,5	hunn
83	23	15 °C	A1	15,3	9,5	hunn
84	23	12 °C	K	39,3	12	hunn
85	23	15 °C	K	15,7	9	hann?
86	23	12 °C	A2	23,5	10,5	hunn
87	23	12 °C	A2	23,5	10,5	hunn
88	24	15 °C	K	29,6	11,5	hunn
89	24	15 °C	K	28,5	11,5	hunn
90	24	15 °C	K	26,1	10,7	hunn
91	24	12 °C	K	32,1	11,5	hunn
92	24	12 °C	K	22,6	10,4	hunn
93	24	12 °C	K	48,3	13,5	hunn
94	24	15 °C	A1	22,6	10,4	hunn
95	24	15 °C	A2	26,7	10,5	hunn
96	24	15 °C	A2	17,1	9,7	hunn
97	24	15 °C	A2	26,5	11	hunn
98	24	15 °C	A2	39,8	12,5	hunn
99	24	15 °C	A2	13,2	45,4	hunn
100	24	15 °C	A1	14,1	9	hunn

Tabell D10, fortsettelse.

Fisk nr.	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
101	25	6 °C	A1	21,8	10,5	hunn
102	25	15 °C	A2	26	10	hunn
103	25	15 °C	A2	19	10	hunn
104	25	9 °C	A2	34,8	12	hunn
105	25	9 °C	A1	20,2	10	hunn
106	25	9 °C	A1	15,3	9,5	hunn
107	25	9 °C	A1	20,5	10	hunn
108	25	15 °C	K	11	8,5	hunn
109	25	12 °C	K	20,3	10	hunn
110	25	12 °C	K	45,2	13	hunn
111	25	12 °C	K	27,6	11,5	hunn
112	25	12 °C	A1	26	11	hunn
113	25	12 °C	A1	23,3	10,5	hunn
114	25	15 °C	A1	19,1	9,7	hunn
115	26	15 °C	A2	27,7	11	hunn
116	26	15 °C	A2	17,5	9	hunn
117	26	9 °C	A2	42,8	12	hunn
118	26	9 °C	A2	17,5	9,2	hunn
119	26	9 °C	A1	69,1	15	hunn
120	26	12 °C	A1	14,5	51,9	hann
121	26	12 °C	A1	56,8	15	hann
122	26	12 °C	A1	24,8	11	hann
Gjennomsnitt				39,0	11,8	

* : Ikke målt

Overlevende fisk

Tabell D11. Vekt (gram), lengde (centimeter) og kjønn hos de overlevende fiskene i forsøk 2.

Fisk nr	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
1	1	15 °C	A1	23,0	10,0	hunn
2	2			26,7	10,5	hunn
3	3			38,2	12,5	hann
4	4			27,1	10,0	hunn
5	5			12,5	8,5	hunn
6	6			81,2	15,5	hann
7	7			19,2	10,0	hunn
8	8			29,0	12,0	hunn
9	9			26,6	12,0	hunn
10	10			38,3	13,0	hann
11	11			26,1	11,5	hunn
12	12			19,9	11,0	hann
13	13			14,6	10,0	sekundær
14	14			29,7	12,0	sekundær
15	15			33,9	13,0	hunn
16	16			19,2	11,0	sekundær
17	17			40,0	13,0	hann
18	1	15 °C	A2	25,3	13,0	hunn
19	2			17,1	9,7	hunn
20	3			13,2	45,4	hunn
21	4			34,7	13,0	hunn
22	5			82,2	18,0	hann
23	6			123,5	19,0	hann
24	7			26,9	13,5	hann
25	8			47,5	14,0	hann
26	9			37,7	14,0	hunn
27	10			50,0	15,0	hunn
28	11			28,9	12,5	hunn
29	12			31,0	12,5	hunn
30	13			20,5	11,5	hunn
31	14			14,3	10,5	hunn
32	15			20,5	11,0	hunn
33	16			32,7	12,5	hunn
34	17			28,5	11,5	hann
35	1	15 °C	K	76,9	16,5	hann
36	2			15,7	9,0	sekundær
37	3			29,6	11,5	hunn
38	4			28,5	11,5	hunn
39	5			34,0	13,5	hunn
40	6			55,5	15,5	hunn
41	7			39,2	14,2	hann
42	8			34,2	13,5	hunn
43	9			34,3	13,9	hunn
44	10			30,6	13,5	hunn
45	11			38,6	14,2	hunn
46	12			34,7	14,0	hunn
47	13			35,8	13,9	hunn
48	14			69,6	17,0	hunn
49	15			18,0	11,4	hunn
50	16			17,2	11,7	hunn
51	17			31,9	14,6	hunn
52	18			31,0	13,4	hunn

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
53	19	15 °C	K	17,9	11,6	hunn
54	20			22,0	12,1	hunn
55	21			21,3	11,9	hunn
56	22			54,2	16,0	hann
57	23			46,6	16,6	hunn
58	24			41,3	15,4	hann
59	25			42,8	15,6	hann
60	26			68,5	17,3	hann
61	27			64,2	17,5	hann
62	28			65,0	17,4	hann
63	29			29,9	14,0	hann
64	30			47,9	15,6	hann
65	31			73,4	17,4	hann
66	32			64,9	17,2	hann
67	33			49,0	15,7	hann
68	34			22,8	12,3	hann
69	35			19,2	11,9	hunn
70	1	12 °C	A1	60,2	15,5	hunn
71	2			54,5	15,5	hann
72	3			59,9	16,0	hunn
73	4			58,0	16,0	sekundær
74	5			30,3	13,0	sekundær
75	6			99,8	18,6	hunn
76	7			55,3	15,6	hunn
77	8			38,9	13,7	hunn
78	9			38,9	14,9	hunn
79	10			59,3	15,8	hunn
80	11			23,5	12,1	hunn
81	12			29,5	13,3	hunn
82	13			10,6	9,9	hunn
83	14			28,7	12,9	hunn
84	15			21,9	12,1	hunn
85	16			34,3	13,4	hunn
86	17			19,0	12,9	hunn
87	18			41,8	15,7	hann
88	19			60,1	16,6	hann
89	20			96,8	19,1	hann
90	21			91,9	18,7	hann
91	22			84,8	19,0	hann
92	23			16,9	10,8	hunn
93	24			26,0	11,0	hunn
94	25			24,8	11,0	hann
95	1	12 °C	A2	36,0	14,5	hunn
96	2			33,2	13,5	hunn
97	3			49,5	15,5	hunn
98	4			26,3	13,0	hunn
99	5			62,4	17,0	hunn
100	6			33,3	13,4	hunn
101	7			39,7	13,8	hunn

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
102	8	12 °C	A2	42,6	14,1	hunn
103	9			35,7	13,7	hunn
104	10			29,9	13,3	hunn
105	11			51,2	15,2	hunn
106	12			30,0	13,1	hunn
107	13			22,5	12,4	hunn
108	14			27,2	12,9	hunn
109	15			28,5	13,1	hunn
110	16			31,2	13,5	hunn
111	17			30,6	13,6	hunn
112	18			21,7	1,9	hunn
113	19			74,1	17,9	hann
114	20			73,5	17,0	hann
115	21			105,8	19,2	hann
116	22			91,2	18,6	hann
117	23			43,4	15,2	hann
118	24			54,9	15,8	hann
119	25			42,5	14,9	hann
120	26			62,6	16,6	hann
121	27			43,3	15,3	hann
122	28			58,0	16,4	hann
123	29			38,2	15,2	hann
124	30			31,0	13,6	hann
125	31			40,5	14,6	hunn
126	32			23,5	10,5	hunn
127	1	12 °C	K	38,1	14,0	hunn
128	2			25,1	12,5	hunn
129	3			30,8	13,2	hunn
130	4			54,3	15,2	hunn
131	5			21,3	12,6	hunn
132	6			5,1	12,7	hunn
133	7			25,2	13,4	hunn
134	8			26,3	12,9	hunn
135	9			28,9	13,2	hunn
136	10			21,9	12,0	hunn
137	11			21,2	11,9	hunn
138	12			18,5	12,5	hunn
139	13			23,8	13,2	hunn
140	14			25,6	13,2	hunn
141	15			46,9	16,0	hann
142	16			26,0	10,7	hunn
143	17			32,1	11,1	hunn
144	18			22,6	10,4	hunn
145	19			48,3	13,5	hann
146	21			39,3	12,0	hunn
147	22			30,8	11,5	hunn
148	1	9 °C	A1	20,2	10,0	hunn
149	2			36,1	13,5	hunn
150	3			117,2	17,0	hann

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
151	4	9 °C	A1	38,2	13,0	hann
152	5			28,9	12,6	hunn
153	6			42,3	14,5	hunn
154	7			38,1	14,1	hunn
155	8			18,5	11,3	hunn
156	9			25,0	12,6	hunn
157	10			31,8	13,1	hunn
158	11			37,4	14,1	hunn
159	12			33,7	13,5	hunn
160	13			23,9	12,6	hunn
161	14			36,0	13,8	hunn
162	15			20,4	11,6	hunn
163	16			35,3	13,6	hunn
164	17			23,6	12,4	hunn
165	18			26,7	12,2	hunn
166	19			13,4	10,1	hunn
167	20			59,3	16,5	hann
168	21			73,0	17,1	hann
169	22			47,4	15,6	hann
170	23			44,6	15,2	hann
171	24			58,1	16,1	hann
172	25			35,6	13,9	hann
173	26			26,2	12,6	hann
174	27			29,1	13,4	Hann
175	28			21,5	12	hann
176	1	9 °C	A2	17,5	9,2	hunn
177	2			42,8	12,0	hunn
178	3			32,9	13,5	hunn
179	4			34,2	14,0	hann
180	5			47,8	14,1	hunn
181	6			27,1	12,0	hunn
182	7			32,2	13,2	sekundær?
183	8			30,4	13,2	hunn
184	9			33,9	13,6	hunn
185	10			40,3	14,2	hunn
186	11			39,3	13,9	hunn
187	12			32,1	12,6	hunn
188	13			44,5	14,3	hunn
189	14			18,3	11,0	hunn
190	15			30,2	13,0	hunn
191	16			30,8	13,2	hunn
192	17			54,4	16,0	hunn
193	18			34,7	13,9	hunn
194	19			53,2	15,5	hunn
195	20			23,3	12,2	hunn
196	21			36,0	14,0	hunn
197	22			35,8	14,1	hunn
198	23			25,1	12,4	hunn
199	24			17,0	11,0	hann

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Kar	Gruppe	Vekt	Lengde	Kjønn
200	25	9 °C	A2	19,4	11,6	hann
201	26			45,4	15,6	hann
202	27			61,8	16,8	hann
203	28			48,6	14,9	hann
204	29			41,8	15,0	hann
205	30			53,6	16,4	hann
206	31			49,6	15,9	hann
207	32			35,1	14,1	hann
208	1	9 °C	K	38,0	14,4	hunn
209	2			33,5	13,3	hunn
210	3			32,0	13,5	hunn
211	4			25,0	11,9	hunn
212	5			23,8	11,9	hunn
213	6			48,1	14,7	hunn
214	7			31,4	13,3	hunn
215	8			30,8	13,0	hunn
216	9			24,1	12,0	hunn
217	10			36,2	13,6	hunn
218	11			30,8	12,9	hunn
219	12			18,3	11,0	hunn
220	13			38,5	14,0	hunn
221	14			25,9	12,6	hunn
222	15			19,7	11,6	hunn
223	16			13,1	9,9	hunn
224	17			33,2	13,1	hunn
225	18			24,5	12,4	hunn
226	19			25,5	12,3	hunn
227	20			53,4	15,4	hunn
228	21			20,8	11,9	hunn
229	22			13,0	9,9	hunn
230	23			25,7	12,7	hunn
231	24			26,3	12,6	hunn
232	25			22,6	11,8	hunn
233	26			35,4	13,3	hunn
234	27			23,4	12,0	hunn
235	28			75,3	17,4	hunn
236	29			115,7	20,6	hann
237	30			92,4	19,2	hann
238	31			67,0	17,0	hann
239	32			82,1	18,1	hann
240	33			48,6	15,4	hann
241	34			45,6	15,0	hann
242	35			47,3	15,4	hann
243	36			44,2	15,3	hann
244	37			40,8	14,7	hann
245	1	6 °C	A1	42,0	14,6	hunn
246	2			26,0	10,0	hunn
247	3			75,4	18,2	hann
248	4			39,2	14,6	hann

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Kar	Gruppe	Vekt	Lengde	Kjønn
249	5	6 °C	A1	56,3	15,9	hann
250	6			26,7	12,5	hunn
251	7			26,7	12,4	hunn
252	8			33,6	13,5	hann
253	9			29,9	12,9	hunn
254	10			33,9	13,7	hunn
255	11			43,5	15,0	hunn
256	12			24,8	12,3	hunn
257	13			36,2	13,8	hunn
258	14			30,3	12,9	hunn
259	15			47,1	14,6	hunn
260	16			29,0	13,3	hunn
261	17			42,9	13,9	hunn
262	18			19,8	11,4	hunn
263	19			33,7	13,4	hunn
264	20			26,2	12,5	hunn
265	21			18,5	11,3	hunn
266	22			38,4	13,4	hunn
267	23			47,4	15,2	hunn
268	24			13,7	10,3	hunn
269	25			11,8	9,9	hunn
270	26			12,9	10,2	hunn
271	27			33,8	13,9	hann
272	28			53,6	16,1	hann
273	29			43,1	15,1	hann
274	30			42,4	14,9	hann
275	31			46,2	15,4	hann
276	32			48,2	16,1	hann
277	33			2,07	13,0	hann
278	34			19,8	11,8	hann
279	35			24,4	12,6	hann
280	36			22,6	12,0	hann
281	37			40,8	14,7	hann
285	1	6 °C	A2	39,0	14,3	hunn
283	2			41,3	14,9	hann
284	3			33,1	13,5	hunn
285	4			58,0	16,8	hunn
286	5			51,7	16,0	hann
287	6			29,4	13,0	hunn
288	7			27,5	12,5	hunn
289	8			43,7	14,9	hunn
290	9			61,0	16,2	hunn
291	10			27,0	13,2	hunn
292	11			23,0	11,9	hunn
293	12			39,6	14,3	hunn
294	13			23,3	12,0	hunn
295	14			45,7	15,0	hunn
296	15			33,3	13,5	hunn
297	16			21,5	11,9	hunn
298	17			44,2	14,4	hunn

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Kar	Gruppe	Vekt	Lengde	Kjønn
299	18	6 °C	A2	25,3	12,0	hunn
300	19			33,3	13,6	hunn
301	20			23,9	12,1	hunn
302	21			23,9	12,1	hunn
303	22			30,2	12,6	hunn
304	23			27,4	12,6	hunn
305	24			28,8	12,8	hunn
306	25			12,2	10,0	hunn
307	26			16,8	11,4	hunn
308	27			27,1	12,9	hann
309	28			61,9	17,1	hann
310	29			56,9	16,5	hann
311	30			51,7	15,1	hann
312	31			52,1	16,1	hann
313	32			59,3	16,6	hann
314	33			52,3	15,7	hann
315	34			38,6	14,5	hann
316	35			26,4	12,8	hann
317	36			35,6	14	hann
318	37			22,6	12,2	hann
319	38			22,6	12,2	hann
320	39			24,9	12,9	hann
321	1	6 °C	K	39,9	13,8	hunn
322	2			62,4	17,8	hann
323	3			60,3	15,9	hunn
324	4			42,7	14,6	hunn
325	5			47,6	15,0	hann
326	6			38,0	14,4	hunn
327	7			32,5	13,3	hunn
328	8			32,0	13,5	hunn
329	9			25,0	11,9	hunn
330	10			23,8	11,9	hunn
331	11			48,1	14,7	hunn
332	12			31,4	13,3	hunn
333	13			30,8	13,0	hunn
334	14			18,3	11,0	hunn
335	15			38,5	14,0	hunn
336	16			25,9	12,6	hunn
337	17			19,7	11,6	hunn
338	18			13,1	9,9	hunn
339	19			33,2	13,1	hunn
340	20			24,5	12,4	hunn
341	21			25,5	12,3	hunn
342	22			53,4	15,4	hunn
343	23			20,8	11,9	hunn
344	24			13,1	9,9	hunn
345	25			25,7	12,7	hunn
346	26			26,3	12,6	hunn
347	27			22,6	11,8	hunn
348	28			35,4	13,3	hunn

Tabell D11, fortsettelse.

Fisk nr	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
349	29			23,4	12,1	hunn
350	30			75,3	17,4	hunn
351	31			115,7	20,6	hann
352	32			92,4	19,2	hann
353	33			67,0	17,0	hann
354	34			82,1	18,1	hann
355	35			48,6	15,4	hann
356	36			45,6	15,0	hann
357	37			47,3	15,4	hann
358	38			22,7	12,7	hann
Gjennomsnitt				37,1	13,5	

Forsøk 3, 12 °C

Døde fisk

Tabell D12. Vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 3, 12 °C.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
1	6	CECT	A1	41,3	14,2	hunn
2	7	NRP 45	A1	27,9	12,0	hann
3	8	NRP 45	A2	39,7	14,0	hunn
4	8	NRP 45	A2	80,0	17,5	hunn
5	11	LP2	A1	37,7	13,7	hunn
6	11	LP2	A1	58,0	15,0	hann
7	12	K	A1	55,6	15,2	hunn
8	12	K	A1	26,5	12,4	hunn
9	13	CECT	A2	31,0	13,0	hunn
10	13	NRP 45	A2	40,9	14,4	hann
11	13	NRP 45	A2	51,1	14,5	hann
12	13	NRP 45	A2	27,0	12,0	hunn
13	13	NRP 45	A2	81,0	15,5	hunn
14	13	LP2	A1	39,8	13,5	hunn
15	13	NRP 45	A1	30,0	12,5	hunn
16	14	LP2	A2	57,8	15,4	hann
17	14	NRP 45	A2	23,6	11,5	hann
18	15	CECT	A1	37,0	14,5	hann
19	15	CECT	A2	42,3	13,7	hunn
20	15	NRP 45	A2	51,2	13,0	hunn
21	15	NRP 45	A2	30,5	12,5	hunn
22	15	NRP 45	A1	22,5	11,5	hann
23	15	NRP 45	A1	25,5	11,5	hann
24	15	K	A1	28,1	12,0	hann
25	15	K	A1	17,2	11,0	hunn
26	16	LP2	A1	27,5	11,5	hunn
27	16	LP2	A1	20,0	11,0	hann
28	17	K	A1	27,8	12,3	hunn
29	17	K	A2	20,3	11,3	hann
30	17	LP2	A1	14,0	8,5	hunn
31	17	NRP 45	A1	38,4	14,2	hann
32	17	NRP 45	A1	42,7	14,3	hunn
33	17	NRP 45	A1	16,1	10,6	hunn
34	18	NRP 45	A1	40,3	14,5	hann
35	18	NRP 45	A1	34,4	13,2	hunn
36	18	NRP 45	A1	16,7	11,0	hunn
37	18	CECT	A1	62,2	16,0	hann
38	18	K	A2	15,2	10,0	hunn
39	20	K	A2	23,8	11,8	hunn
40	20	K	A2	18,8	11,0	hann
41	20	K	A2	34,8	12,5	hunn
42	19	LP2	A1	25,2	12,0	hunn
43	19	CECT	A1	25,0	11,0	hunn
44	19	NRP 45	A2	17,5	10,7	hunn
45	19	NRP 45	A2	29,0	12,7	hunn

Tabell D12, fortsettelse.

Fisk nr	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
46	19	NRP 45	A2	34,0	13,0	hunn
47	19	NRP 45	A2	25,5	11,1	hunn
48	20	NRP 45	A2	22,3	12,0	hann
49	20	NRP 45	A2	29,1	12,5	hunn
50	20	NRP 45	A2	61,0	15,2	hann
51	20	NRP 45	A2	28,4	12,0	hunn
52	20	NRP 45	A2	37,4	13,0	hunn
53	20	NRP 45	A2	99,2	18,5	hann
54	20	K	A1	27,7	11,8	hunn
55	20	K	A1	13,2	9,2	hann
56	20	K	A1	28,5	12,5	hunn
57	20	K	A2	27,2	12,0	hann
58	20	K	A2	42,5	14,2	hann
59	20	K	A2	25,1	12,2	hunn
60	20	K	A2	22,4	11,5	hunn
61	21	NRP 45	A1	37,3	14,0	hann
*63	21	NRP 45	A2	26,6	12,2	hunn
64	21	NRP 45	A2	27,2	12,5	hunn
65	21	NRP 45	A2	38,5	13,5	hunn
66	21	CECT	A1	34,8	12,5	hunn
67	21	CECT	A1	28,0	13,0	hunn
68	21	K	A1	22,8	11,4	hunn
69	21	K	A1	16,6	11,5	hann
Gjennomsnitt				33,9	12,8	

*Nr 62 utgått

Overlevende fisk

Tabell D13. Vekt (gram), lengde (centimeter) og kjønn hos de overlevende fiskene i forsøk 3, 12 °C.

Fisk nr.	Fisk fordelt på			Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
	gruppe	Gruppe	Kar			
1	1	K	A1	35,3	13,2	hunn
2	2			67,1	17,0	hann
3	3			80,8	18,0	hann
4	4			75,2	18,2	hann
5	5			34,3	14,2	hunn
6	6			51,2	15,8	hunn
7	7			46,7	14,0	hann
8	8			38,0	13,8	hann
9	9			79,5	14,1	hann
10	10			32,3	13,5	hunn
11	11			43,3	14,4	hunn
12	12			36,1	14,0	hunn
13	13			82,1	17,9	hann
14	14			46,7	15,1	hann
15	15			28,8	13,0	hunn
16	16			28,0	12,3	hunn
17	17			17,2	11,0	hunn
18	18			17,4	11,5	hunn
19	19			24,7	12,4	hunn
20	20			76,7	15,0	hunn
21	21			78,3	18,2	hann
22	22			85,4	18,5	hann
23	23			71,0	16,9	hann
24	24			34,3	13,5	hunn
25	25			61,9	17,0	hann
26	26			59,6	16,1	hann
27	27			54,3	15,8	hann
28	28			41,1	14,7	hunn
29	29			34,4	13,5	hunn
30	30			38,7	14,8	hunn
31	31			38,6	15,1	hunn
32	32			55,2	15,6	hann
33	33			19,0	11,5	sekundær
34	34			23,3	12,1	hunn
35	35			49,5	14,0	hunn
36	36			41,0	14,2	hann
37	37			76,7	15,0	hunn
38	38			78,3	18,2	hann
39	1	K	A2	65,2	15,8	hann
40	2			70,7	16,8	hann
41	3			63,7	16,3	hann
42	4			91,7	19,0	hann
43	5			40,6	14,5	hunn
44	6			37,3	14,0	hunn
45	7			95,7	19,4	hann
46	8			36,3	13,4	hunn

Tabell D13, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
47	9	K	A2	41,5	14,3	hunn
48	10			75,3	18,7	hann
49	11			29,3	12,0	hunn
50	12			34,8	14,6	hunn
51	13			39,3	13,8	hunn
52	14			13,5	31,7	hunn
53	15			33,7	16,2	hunn
54	16			64,5	16,6	hann
55	17			63,7	16,3	hann
56	18			21,3	11,5	hunn
57	19			76,3	17,7	hann
58	20			72,0	18,0	hann
59	21			36,4	14,1	hunn
60	22			52,8	15,6	hann
61	23			60,4	16,7	hann
62	24			67,4	17,2	hann
63	25			47,9	15,1	hunn
64	26			45,9	15,4	hann
65	27			60,8	16,1	hann
66	28			44,8	14,4	hann
67	29			41,6	14,9	hann
68	30			43,1	14,4	hunn
69	31			17,0	10,9	hunn
70	32			68,4	16,8	hann
71	33			21,9	12,0	hunn
72	34			62,8	15,6	hann
73	35			26,1	12,3	hunn
74	36			45,1	14,0	hunn
75	37			21,8	11,9	hunn
76	38			28,9	12,4	hunn
77	39			28,4	12,5	hunn
78	40			23,7	11,6	hann
79	41			23,3	12,5	hunn
80	42			68,6	16,2	hann
81	43			28,8	11,4	hunn
82	1	CECT 4600	A1	42,4	15,1	hunn
83	2			78,9	17,8	hann
84	3			80,6	18,5	hann
85	4			60,2	16,5	hann
86	5			22,0	12,0	hann
87	6			90,2	19,0	hann
88	7			79,7	17,5	hann
89	8			58,8	16,0	hann
90	9			27,0	12,1	hunn
91	10			42,2	15,0	hann
92	11			50,4	15,8	hann
93	12			39,4	14,6	hunn
94	13			52,1	15,4	hunn
95	14			35,6	13,7	hunn

Tabell D13, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på		Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
	gruppe	Gruppe				
96	15	CECT 4600	A1	31,4	12,8	hann
97	16			78,5	18,0	hann
98	17			30,9	13,0	hann
99	18			55,7	16,0	hann
100	19			29,2	13,0	hunn
101	20			38,5	14,5	hunn
102	21			76,8	18,5	hann
103	22			31,0	13,7	hunn
104	23			29,9	13,0	hunn
105	24			52,7	16,0	hann
106	25			41,6	14,0	hann
107	26			29,3	12,5	hann
108	27			44,3	14,2	hunn
109	28			59,2	16,2	hunn
110	29			26,7	12,8	hunn
111	30			54,2	16,0	hunn
112	31			39,5	14,0	hunn
113	32			66,7	17,0	hann
114	33			46,0	15,8	hann
115	34			43,1	15,0	hann
116	35			30,1	13,1	hunn
117	36			53,8	16,0	hann
118	37			45,2	15,0	hunn
119	38			59,9	16,4	hann
120	39			76,3	17,8	hann
121	40			42,8	15,0	hann
122	41			35,0	14,0	hunn
123	42			61,8	16,5	hunn
124	43			64,2	17,0	hann
125	44			61,9	16,8	hann
126	1	CECT 4600	A2	66,2	17,0	hann
127	2			40,5	14,7	hunn
128	3			36,4	14,6	hann
129	4			30,9	13,0	hunn
130	5			97,2	18,5	hann
131	6			86,1	18,0	hann
132	7			55,0	16,0	hann
133	8			47,2	15,8	hann
134	9			60,3	16,4	hunn
135	10			74,4	18,0	hann
136	11			59,2	16,4	hann
137	12			27,3	13,3	hunn
138	13			42,2	13,9	hunn
139	14			21,3	12,0	hunn
140	15			45,2	15,0	hunn
141	16			59,9	16,4	hann
142	17			76,3	17,8	hann
143	18			42,8	15,0	hann
144	19			35,0	14,0	hunn

Tabell D13, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på		Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
	gruppe	Gruppe				
145	20	CECT 4600	A2	61,8	16,5	hunn
146	21			64,2	17,0	hann
147	22			61,9	16,8	hann
148	23			70,1	17,5	hann
149	24			37,7	13,5	hunn
150	25			61,3	17,2	hann
151	26			34,2	14,0	hann
152	27			29,6	11,7	hunn
153	28			56,3	15,8	hann
154	29			58,1	16,5	hann
155	30			45,7	15,0	hann
156	31			51,0	15,6	hann
157	32			21,5	12,6	hunn
158	33			22,4	12,9	hunn
159	34			24,3	12,6	hunn
160	35			45,9	15,3	hunn
161	36			45,2	15,0	hann
162	37			34,2	14,2	hann
163	38			52,2	15,6	hunn
164	39			46,3	15,2	hann
165	40			23,0	12,1	hann
166	41			25,0	12,5	hunn
167	42			50,5	15,0	hunn
168	43			20,2	11,3	hann
169	44			47,2	15,2	hann
170	45			67,1	16,6	hunn
171	46			52,8	16,1	hann
172	47			29,2	12,8	hunn
173	48			40,5	14,4	hann
174	1	LP2	A1	84,4	17,0	hunn
175	2			58,3	16,4	hann
176	3			52,2	15,0	hunn
177	4			85,7	18,0	hann
178	5			46,3	15,5	hann
179	6			45,2	16,5	hunn
180	7			103,0	19,3	hann
181	8			49,0	15,0	hann
182	9			54,2	15,4	hunn
183	10			46,7	15,0	hunn
184	11			75,6	17,0	hann
185	12			38,3	13,5	hunn
186	13			67,3	17,5	hunn
187	14			73,9	17,5	hann
188	15			56,5	16,5	hann
189	16			52,2	15,2	hunn
190	17			46,1	15,0	hann
191	18			34,9	14,0	hunn
192	19			106,3	19,5	hann

Tabell D13, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på		Kar	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
	gruppe	Gruppe				
193	20	LP2	A1	57,4	15,2	hunn
194	21			56,7	16,0	hann
195	22			58,3	16,5	hunn
196	23			22,4	12,0	hunn
197	24			101,4	19,5	hann
198	25					ikke grønngylt
199	26			44,2	14,9	hann
200	27			56,3	15,5	hann
201	28			47,3	15,0	hann
202	29			87,7	17,5	hann
203	30			47,5	15,0	hunn
204	31			66,8	15,6	hunn
205	32			19,9	10,2	hunn
206	33			87,8	18,0	hunn
207	34			33,8	13,2	hunn
208	35			74,5	17,5	hann
209	36			45,4	15,0	hann
210	37			45,1	14,0	hunn
211	38			61,9	16,0	hunn
212	39			53,5	15,6	hunn
213	40			50,7	15,8	hann
214	41			57,3	16,4	hann
215	42			46,0	14,5	hunn
216	43			61,9	17,2	hunn
217	44			22,0	11,5	hann
218	45			73,7	16,2	hann
219	1	LP2	A1	60,3	15,7	hann
220	2			78,2	18,0	hann
221	3			81,1	17,6	hunn
222	4			50,4	15,0	hann
223	5			73,4	17,0	hann
224	6			81,3	17,9	hann
225	7			42,7	15,0	hunn
226	8			100,8	18,5	hann
227	9			82,2	17,5	hann
228	10			94,4	18,0	hann
229	11			72,8	16,5	hunn
230	12			57,2	16,0	hunn
231	13			66,5	16,5	hann
232	14			61,2	16,0	hann
233	15			67,5	17,0	hann
234	16			60,4	16,0	hann
235	17			39,2	14,4	hann
236	18			54,4	15,7	hann
237	19			40,2	14,8	hann
238	20			54,2	16,2	hann
239	21			65,0	17,5	hann
240	22			51,1	15,7	hann
241	23			39,5	14,5	hann

Tabell D13, fortsettelse.

Fisk nr	Fisk fordelt på			Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
	gruppe	Gruppe	Kar			
242	24	LP2	A2	10,8	9,2	hunn
243	25			46,9	15,1	hann
244	26			76,0	17,9	hann
245	27			42,1	14,8	hunn
246	28			45,2	15,1	hann
247	29			50,5	15,0	hunn
248	30			20,2	11,3	hann
249	31			47,2	15,2	hann
250	32			67,1	16,6	hunn
251	33			52,8	16,1	hann
252	34			29,2	12,8	hunn
253	35			40,5	14,4	hann
254	36			48,5	15,0	hunn
255	37			42,6	14,8	hann
256	38			85,7	18,8	hann
257	39			44,7	15,7	hann
258	40			29,0	12,1	hunn
259	41			53,0	16,0	hann
260	42			64,4	16,4	hann
261	43			85,5	18,4	hann
262	44			73,5	17,5	hann
263	45			53,1	15,9	hann
264	46			69,2	16,9	hann
265	47			95,0	18,8	hann
266	48			64,9	16,5	hann
267	49			19,4	11,0	hunn
268	1	NRP 45	A1	37,9	14,4	hann
269	2			31,6	13,4	hunn
270	3			46,1	14,8	hann
271	4			65,5	16,5	hann
272	5			77,5	18,0	hann
273	6			97,5	19,5	hunn
274	7			47,6	15,0	hunn
275	8			47,7	15,0	hann
276	9			48,4	15,0	hann
277	10			77,5	18,0	hann
278	11			87,7	17,9	hann
279	12			37,1	13,8	sekundær
280	13			94,0	18,5	hann
281	14			44,6	14,8	hunn
282	15			46,3	15,0	hann
283	16			53,9	15,6	hunn
284	17			22,9	12,0	hunn
285	18			54,9	16,1	hann
286	19			41,2	14,2	hann
287	20			47,5	15,3	hunn
288	21			40,5	14,7	hunn
289	22			69,9	17,0	hann

Tabell D13, fortsettelse.

Fisk nr.	Fisk fordelt på			Vekt (g)	Lengde (cm)	Kjønn
	gruppe	Gruppe	Kar			
290	23	NRP 45	A1	83,9	18,2	hann
291	24			28,9	12,9	hunn
292	25			19,1	11,7	hunn
293	26			18,7	11,0	hunn
294	27			20,0	11,9	hunn
295	28			21,1	11,8	hunn
296	29			37,0	14,3	hunn
297	30			55,8	16,5	hann
298	31			35,5	13,8	hunn
299	32			63,0	16,5	hann
300	33			38,1	15,0	hann
301	34			54,7	15,7	hunn
302	35			24,0	12,2	hunn
303	36			71,4	17,5	hann
304	37			25,6	12,1	hunn
305	38			73,5	17,8	hann
306	39			58,1	17,0	hunn
307	40			72,0	18,0	hann
308	41			34,0	14,0	hunn
309	1	NRP 45	A2	76,5	18,0	hann
310	2			70,4	17,6	hann
311	3			87,6	18,0	hann
312	4			100,6	19,5	hann
313	5			84,2	18,2	hann
314	6			23,6	12,0	hann
315	7			64,6	17,0	hunn
316	8			46,6	15,2	hann
317	9			45,0	15,5	hunn
318	10			46,5	15,0	hunn
319	11			46,3	15,6	hann
320	12			76,6	18,0	hann
321	13			68,0	17,0	hann
322	14			85,0	18,0	hann
323	15			57,1	16,0	hann
324	16			52,9	16,5	hann
325	17			22,6	11,5	hann
326	18			57,3	16,0	hann
327	19			24,7	13,0	hunn
328	20			79,7	17,5	hann
329	21			58,8	16,0	hann
330	22			27,0	12,1	hunn
331	23			42,2	15,0	hann
332	24			50,1	15,3	hann
333	25			39,0	14,1	hunn
334	26			52,1	15,4	hunn
335	27			36,1	13,9	hunn
336	28			31,4	12,8	hann
Gjennomsnitt				51,9	15,3	

Forsøk 3, 15 °C

Døde fisk

Tabell D14. Vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 3, 15 °C

Fisk nr.	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	kjønn
1	4	LP2	A1	23,8	10,5	hunn
2	4	NRP45	A1	45,8	15,0	hann
3	5	LP2	A2	32,1	13,2	hunn
4	5	LP2	A2	30,6	14,4	hunn
5	5	LP2	A1	31,3	13,2	hunn
6	5	LP2	A1	55,8	16,6	hunn
7	5	LP2	A1	30,5	13,4	hunn
8	5	LP2	A1	39,8	14,3	hunn
9	6	LP2	A1	61,5	16,0	hunn
10	6	LP2	A1	56,0	15,5	hunn
11	6	LP2	A2	33,8	13,0	hunn
12	6	LP2	A2	24,4	12,5	hunn
13	6	K	A1	25,3	12,0	hunn
14	7	K	A1	23,1	11,5	hunn
15	7	K	A2	28,2	13,0	hunn
16	7	K	A2	41,1	15,0	hunn
17	7	LP2	A2	44,1	13,5	hunn
18	7	LP2	A2	36,6	13,0	hann
19	7	LP2	A2	41,6	14,0	hunn
20	7	LP2	A2	35,0	14,5	hunn
21	8	K	A1	31,0	13,5	hunn
22	8	K	A2	45,4	14,5	hann
23	8	LP2	A1	24,3	12,0	sekundær
24	8	LP2	A2	27,1	12,0	hann
25	8	LP2	A2	52,6	14,5	hunn
26	8	LP2	A2	15,7	10,5	hunn
27	9	K	A1	71,4	17,0	hann
28	9	NRP45	A2	61,5	16,5	hunn
29	9	CECT4600	A2	50,6	16,0	hunn
30	9	LP2	A1	32,7	13,0	hunn
31	9	LP2	A2	25,6	12,5	hunn
32	10	K	A2	30,8	13,0	hunn
33	10	CECT4600	A1	27,1	13,0	hunn
34	10	CECT4600	A2	51,5	15,0	hunn
35	10	LP2	A2	60,6	16,0	hunn
36	10	LP2	A1	42,0	14,0	hunn
37	10	LP2	A1	58,3	16,2	hann
38	11	K	A1	37,4	14,5	hunn
39	11	LP2	A2	21,0	11,7	hunn
40	11	LP2	A2	46,9	14,5	hunn
41	11	LP2	A1	50,6	15,5	hunn
42	11	CECT4600	A1	14,6	10,5	hunn
43	11	CECT4600	A1	26,4	12,5	hunn

Tabell D14, fortsettelse. Vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 3,15 °C

Fisk nr.	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	kjønn
44	11	CECT4600	A2	78,9	17,5	hunn
45	11	CECT4600	A2	35,7	14,0	hunn
46	11	CECT4600	A2	52,9	15,5	hunn
47	12	NRP45	A2	27,8	12,7	hann
48	12	NRP45	A1	38,7	14,0	hunn
49	12	NRP45	A1	19,9	11,5	hunn
50	12	CECT4600	A2	30,0	12,1	hann
51	12	LP2	A1	53,0	15,7	hann
52	12	LP2	A2	38,2	14,0	hunn
53	13	K	A1	26,6	12,5	hunn
54	13	K	A2	14,4	11,0	hunn
55	13	CECT4600	A2	15,5	10,7	hunn
56	13	CECT4600	A2	26,9	12,6	hunn
57	13	LP2	A2	49,6	15,5	hann
58	13	LP2	A2	21,5	11,5	hunn
59	13	NRP45	A1	25,5	13,0	hunn
60	13	NRP45	A1	22,3	12,0	hunn
61	13	NRP45	A1	33,2	13,0	hunn
62	13	NRP45	A1	28,4	14,2	hunn
63	13	NRP45	A1	36,3	13,5	hunn
64	13	NRP45	A1	52,6	15,5	hunn
65	14	CECT4600	A1	27,0	13,6	hunn
66	14	CECT4600	A1	57,9	17,7	hunn
67	14	CECT4600	A2	37,2	14,4	hunn
68	14	NRP45	A1	31,6	14,0	hunn
69	14	NRP45	A1	17,8	11,6	hunn
70	14	NRP45	A1	35,3	13,9	hunn
71	14	NRP45	A1	14,7	10,8	hunn
72	14	NRP45	A1	37,5	14,2	hunn
73	14	NRP45	A1	34,2	14,0	hunn
74	14	NRP45	A1	28,3	13,5	hunn
75	14	NRP45	A2	30,2	14,1	hunn
76	14	NRP45	A2	35,4	14,3	hunn
77	14	K	A1	21,7	12,0	hunn
78	14	K	A1	34,1	13,9	hunn
79	14	K	A1	27,8	13,4	hunn
80	14	K	A2	28,0	14,2	hunn
81	15	CECT4600	A1	18,7	12,5	hunn
82	15	CECT4600	A2	83,4	18,1	hunn?
83	15	CECT4600	A2	36,1	13,8	hunn
84	15	LP2	A1	57,4	15,9	hann
85	15	LP2	A2	23,3	12,0	hunn
86	15	NRP45	A1	12,1	10,1	hunn
87	15	K	A1	45,2	15,7	hunn?
88	16	CECT4600	A2	23,4	12,4	hann
89	16	CECT4600	A2	49,3	15,3	hann
90	16	CECT4600	A2	24,6	12,6	hunn
91	16	CECT4600	A2	29,1	13,1	hunn
92	16	CECT4600	A2	43,3	14,9	hunn
93	16	CECT4600	A2	56,3	15,2	hunn

Tabell D14, fortsettelse. Vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 3,15 °C

Fisk nr.	Dager etter		Kar	Vekt	Lengde	kjønn
	smitte	Gruppe				
94	16	LP2	A1	51,7	15,2	hunn
95	16	LP2	A1	27,0	12,6	hunn
96	16	NRP45	A2	46,6	15,3	hann
97	16	NRP45	A2	40,4	14,6	hunn
98	16	K	A1	16,1	11,5	hunn
99	16	K	A1	53,1	15,9	hunn
100	16	K	A1	31,2	13,7	hann
101	16	K	A2	21,6	12,6	hunn
102	16	NRP45	A1	29,4	13,1	hunn
103	16	NRP45	A2	43,7	15,2	hann
104	17	CECT4600	A1	58,4	16,1	hunn
105	17	CECT4600	A2	29,6	13,2	hunn
106	17	CECT4600	A2	41,2	15,0	hunn
107	17	CECT4600	A2	45,5	15,4	hann
108	17	CECT4600	A2	20,7	12,6	hunn
109	17	CECT4600	A2	60,8	16,3	hunn
110	17	LP2	A2	31,8	14,3	hunn
111	17	NRP45	A1	33,3	13,4	hunn
112	17	NRP45	A2	32,0	13,4	hann
113	17	K	A1	20,6	12,5	hunn
114	17	NRP45	A1	23,4	12,0	hann
115	17	NRP45	A1	19,5	12,0	hunn
116	17	NRP45	A1	29,6	13,2	hunn
117	18	K	A1	38,7	14,5	hunn
118	18	CECT4600	A1	28,7	14,0	hunn
119	18	CECT4600	A1	23,1	12,7	hunn
120	18	CECT4600	A1	21,1	12,0	hunn
121	18	CECT4600	A2	28,7	13,5	hunn
122	18	CECT4600	A2	24,2	12,5	hunn
123	18	NRP45	A1	25,5	12,0	hann
124	18	NRP45	A1	50,1	15,5	hann
125	18	NRP45	A2	38,5	14,5	hunn
126	18	NRP45	A2	42,4	14,5	hann
127	18	NRP45	A2	19,5	11,5	hunn
128	19	K	A1	21,0	11,7	hunn
129	19	K	A1	48,4	15,1	hann
130	19	K	A1	44,9	14,7	hunn
131	19	K	A2	30,2	13,4	hunn
132	19	K	A2	30,2	13,0	hunn
133	19	K	A2	31,6	14,0	hunn
134	19	CECT4600	A1	41,1	14,5	hann
135	19	CECT4600	A1	39,0	13,0	hunn
136	19	CECT4600	A1	21,1	11,5	hunn
137	19	CECT4600	A1	30,1	13,0	hunn
138	19	CECT4600	A2	24,0	12,5	hunn
139	19	CECT4600	A2	21,8	11,5	hunn
140	19	CECT4600	A2	17,9	11,5	hunn
141	19	CECT4600	A2	33,4	13,5	hunn
142	19	CECT4600	A2	28,0	13,0	hann

Tabell D14, fortsettelse. Vekt, lengde og kjønn hos døde fisk fra forsøk 3,15 °C

Fisk nr.	Dager etter smitte	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	kjønn
143	19	LP2	A1	30,6	12,5	hunn
144	19	LP2	A2	19,0	12,0	hunn
145	19	LP2	A2	23,4	12,2	hann
146	19	LP2	A2	38,7	14,5	hunn
147	19	NRP45	A2	34,5	14,5	hann
148	19	NRP45	A2	47,7	15,3	hunn
149	20	K	A1	40,6	15,0	hunn
150	20	K	A1	24,0	12,0	hunn
151	20	K	A2	32,9	13,5	hunn
152	20	K	A2	43,2	15,5	hunn
153	20	K	A2	24,6	13,0	hunn
154	20	CECT4600	A1	30,6	13,5	hunn
155	20	CECT4600	A1	28,4	13,0	hunn
156	20	CECT4600	A2	24,8	13,0	hann
157	20	CECT4600	A2	51,5	15,0	hunn
158	20	CECT4600	A2	22,3	11,5	hunn
159	20	CECT4600	A2	23,3	12,0	hunn
160	20	CECT4600	A2	19,2	11,5	hunn
161	20	NRP45	A6	38,0	14,5	hunn
162	20	LP2	A3	31,7	14,0	hunn
163	20	LP2	A3	20,4	12,0	hunn
164	20	LP2	A4	43,2	15,0	hann
165	20	LP2	A4	58,2	15,7	hann
166	21	CECT4600	A1	30,5	13,7	hann
167	21	CECT4600	A1	51,2	15,8	hunn
168	21	CECT4600	A1	35,9	14,7	hunn
169	21	CECT4600	A1	70,1	16,8	hann
170	21	CECT4600	A1	21,6	12,0	hann
171	21	CECT4600	A1	39,6	15,5	hann
172	21	LP2	A1	56,0	16,8	hunn
173	21	LP2	A1	22,6	12,6	hunn
174	21	NRP45	A1	56,3	16,3	hann
175	21	NRP45	A1	48,1	15,1	hann
176	21	NRP45	A1	39,3	14,2	hunn
177	21	NRP45	A2	37,5	14,5	hunn
178	21	NRP45	A2	29,0	13,1	hunn
179	21	K	A1	44,0	15,3	hann
180	21	K	A1	30,1	13,9	hunn
181	21	K	A2	50,2	16,6	hann
182	21	K	A2	39,5	14,9	hunn
183	21	K	A2	16,9	11,1	hunn
184	21	K	A2	37,2	14,2	hunn
185	21	K	A2	23,6	12,4	hunn
186	21	K	A2	36,3	13,5	hann
Gjennomsnitt				35,2	13,7	

Overlevende fisk

Tabell D15. Vekt (gram), lengde (centimeter) og kjønn hos de overlevende fiskene i forsøk 3, 15 °C fordelt på smittegrupper. (K = kontroll og A under kolonnen kar = Akvarium).

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
1	1	K	A1	18,6	11,5	hunn
2	2			14,0	11,0	hunn
3	3			65,5	13,0	hunn
4	4			21,2	12,5	hunn
5	5			24,8	14,0	hunn
6	6			21,5	12,0	hunn
7	7			17,6	11,2	hunn
8	8			16,9	11,0	hunn
9	9			26,0	12,9	hann
10	10			37,5	14,4	hunn
11	11			24,9	13,1	hunn
12	12			13,1	11,0	hunn
13	13			64,3	16,9	hann
14	14			24,1	12,9	hunn
15	15			22,5	12,1	hunn
16	16			53,0	17,1	hann
17	17			56,0	16,2	hann
18	18			55,2	17,0	hann
19	19			65,7	17,6	hann
20	20			47,3	16,6	hann
21	21			62,0	17,2	hann
22	22			24,0	13,0	hann
23	23			28,7	13,3	hann
24	24			24,6	12,3	hann
25	25			22,7	12,5	hann
26	26			23,1	12,7	hann
27	27			22,5	12,4	hann
28	28			22,1	12,5	hann
29	29			25,5	13,2	hann
30	30			32,8	14,0	hunn
31	31			20,4	12,5	hunn
32	32			37,9	14,6	hunn
33	33			54,7	17,0	hunn
34	34			41,2	15,6	hunn
35	35			27,1	13,1	hunn
36	36			28,5	13,4	hunn
37	37			27,4	13,1	hunn
38	38			24,0	12,6	hunn
39	39			30,2	14,2	hunn
40	40			11,8	10,3	hunn
41	1	K	A2	45,9	15,0	hann
42	2			29,1	13,2	hann
43	3			39,1	14,9	hunn
44	4			52,8	15,9	hann
45	5			44,5	52,8	hann
46	6			21,7	12,2	hann

Tabell D15, fortsettelse.

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
47	7	K	A2	17,8	11,6	hann
48	8			18,6	12,6	hunn
49	9			49,2	17,0	hann
50	10			45,9	16,0	hann
51	11			59,3	17,2	hann
52	12			52,5	16,6	hann
53	13			27,7	13,2	hann
54	14			28,6	13,3	hann
55	15			35,3	14,8	hann
56	16			49,4	16,3	hann
57	17			60,5	17,8	hann
58	18			30,2	13,2	hann
59	19			50,0	16,9	hann
60	20			26,8	13,2	hann
61	21			59,2	17,0	hann
62	22			36,1	14,8	hann
63	23			35,0	14,1	hann
64	24			45,0	15,7	hann
65	25			29,2	13,1	hann
66	26			16,9	12,2	hann
67	27			21,8	12,2	hann
68	28			21,1	12,6	hann
69	29			25,0	13,0	hann
70	30			20,1	12,4	hann
71	31			39,8	15,6	hunn
72	32			20,6	12,5	hunn
73	33			20,8	12,5	hunn
74	34			27,1	13,2	hunn
75	35			22,8	13,3	hunn
76	36			22,2	13,0	hunn
77	37			18,9	12,1	hunn
78	38			13,7	12,0	hunn
79	39			21,7	12,2	hunn
80	1	CECT 4600	A1	48,8	15,0	hunn
81	2			39,4	14,5	hann
82	3			63,7	16,0	hann
83	4			24,6	12,2	hunn
84	5			20,6	11,5	hunn
85	6			11,6	9,2	hunn
86	7			20,6	12,0	hunn
87	8			38,9	14,5	hunn
88	9			64,2	18,2	hann
89	10			49,5	15,9	hann
90	11			40,9	15,3	hann
91	12			57,1	15,9	hann
92	13			61,0	17,1	hann
93	14			52,4	16,3	hann
94	15			29,8	12,9	hann
95	16	CECT 4600	A1	52,1	16,8	hann

Tabell D15, fortsettelse.

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
96	17			47,8	17,5	hann
97	18			120,8	21,2	hann
98	19			53,6	16,6	hann
99	20			64,4	18,4	hann
100	21			50,7	16,4	hann
101	22			37,8	14,9	hann
102	23			41,2	15,2	hann
103	24			21,7	12,9	hann
104	25			28,7	13,1	hann
105	26			25,5	13,2	hann
106	27			28,1	13,5	hann
107	28			33,4	14,5	hann
108	29			19,6	11,9	hann
109	30			25,0	13,1	hann
110	31			24,7	13,3	hann
111	32			23,0	12,5	hann
112	33			32,0	14,4	hann
113	34			23,3	12,4	hann
114	35			19,1	12,0	hann
115	36			24,3	12,9	hunn
116	37			23,5	13,1	hunn
117	38			44,4	15,8	hunn
118	1	CECT 4600	A2	61,0	17,0	hann
119	2			27,0	12,7	hann
120	3			44,0	15,0	hann
121	4			21,4	11,5	hunn
122	5			46,5	15,0	hann
123	6			15,2	10,2	hunn
124	7			17,0	11,7	hann
125	8			50,1	15,9	hann
126	9			23,3	12,7	hann
127	10			40,2	15,7	hann
128	11			19,3	12,4	hunn
129	12			52,6	15,9	hunn
130	13			38,9	14,9	hann
131	14			31,4	13,7	hann
132	15			43,1	15,6	hann
133	16			26,1	13,0	hann
134	17			50,6	16,1	hann
135	18			37,0	14,9	hann
136	19			23,0	12,5	hann
137	20			23,0	12,6	hann
138	21			23,4	12,5	hann
139	22			27,2	13,2	hann
140	23			16,2	11,6	hunn
141	24					Bergnebb
142	25			29,6	14,6	?
143	1	LP2	A1	45,6	16,0	hann
144	2			50,4	17,0	hann

Tabell D15, fortsettelse.

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
145	3	LP2	A1	20,3	11,8	hann
146	4			47,7	15,0	hann
147	5			28,4	11,3	hann
148	6			55,7	16,1	hann
149	7			26,0	12,5	hann
150	8			21,5	12,4	hann
151	9			54,5	15,0	hann
152	10			58,6	16,2	hann
153	11			67,0	17,0	hann
154	12			25,2	12,4	hann
155	13			59,0	16,3	hann
156	14			27,3	13,1	hann
157	15			23,4	12,6	hann
158	16			35,6	15,0	hann
159	17			48,5	15,7	hann
160	18			25,0	13,6	hann
161	19			50,7	16,8	hann
162	20			39,5	14,7	hann
163	21			45,4	16,1	hann
164	22			41,3	14,7	hann
165	23			23,1	12,6	hann
166	24			40,2	15,1	hann
167	25			58,6	16,1	hann
168	26			59,8	16,8	hann
169	27			29,6	13,2	hann
170	28			34,1	14,7	hann
171	29			29,8	14,0	hann
172	30			21,2	12,0	hann
173	31			24,7	13,1	hann
174	32			20,8	12,5	hunn
175	33			27,9	13,5	hunn
176	34			32,9	14,2	hunn
177	35			22,8	12,6	hunn
178	36			36,9	14,8	hunn
179	37			48,4	16,3	hunn
180	38			26,7	13,5	hunn
181	39			32,1	14,1	hunn
182	1	LP2	A2	28,8	13,5	hann
183	2			19,9	11,5	hunn
184	3			18,8	11,5	hunn
185	4			17,4	11,5	hunn
186	5			63,8	18,0	hann
187	6			40,9	14,7	hunn
188	7			57,3	16,3	hann
189	8			23,2	12,5	hann
190	9			42,5	15,2	hann
191	10			30,1	13,6	hunn
192	11			44,8	15,2	hann
193	12			53,7	16,3	hann

Tabell D15, fortsettelse.

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
194	13	LP2	A2	54,7	16,9	hann
195	14			56,7	16,5	hann
196	15			39,2	14,7	hann
197	16			61,7	17,3	hann
198	17			70,1	17,8	hann
199	18			50,5	16,0	hann
200	19			47,6	16,3	hann
201	20			72,7	17,9	hann
202	21			57,6	17,5	hann
203	22			74,9	18,3	hann
204	23			45,9	16,0	hann
205	24			33,1	14,3	hann
206	25			21,7	12,6	hann
207	26			28,1	13,0	hann
208	27			21,2	12,2	hann
209	28			23,2	12,5	hann
210	29			28,1	13,5	hunn
211	30			22,2	12,5	hunn
212	31			27,8	13,0	hunn
213	32			25,5	13,2	hunn
214	33			21,0	12,0	hunn
215	34			20,6	12,1	hunn
216	35			22,6	13,0	hunn
217	36			19,8	12,7	hunn
218	1	NRP45	A1	40,9	14,0	hunn
219	2			22,2	12,7	hunn
220	3			40,3	15,2	hann
221	4			25,0	13,6	hunn
222	5			45,4	15,4	hann
223	6			23,3	12,3	hunn
224	7			27,0	13,2	hunn
225	8			65,4	18,4	hann
226	9			24,2	12,8	hann
227	10			36,9	14,6	hann
228	11			25,8	12,7	hann
229	12			22,5	12,7	hann
230	13			49,8	16,4	hann
231	14			30,3	13,5	hann
232	15			16,1	11,4	hann
233	16			79,1	18,9	hann
234	17			36,3	14,2	hann
235	18			25,1	13,0	hann
236	19			26,2	13,2	hann
237	20			32,4	14,4	hann
238	21			21,6	11,8	hann
239	22			17,8	11,7	hann
240	23			20,2	12,0	hann
241	24			25,0	13,0	hunn
242	25			24,5	13,4	hunn

Tabell D15, fortsettelse.

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
243	26	NRP45	A1	21,3	12,6	hunn
244	27			14,0	10,7	hunn
245	28					Gressgylt
246	29			27,3	13,2	hunn
247	30			24,2	12,8	hann
248	31			49,7	16,2	hann
249	32			30,5	13,7	hann
250	1			NRP45	A2	63,4
251	2	28,1	13,0			hann
252	3	63,5	16,5			hann
253	4	25,9	12,5			hann
254	5	44,9	15,5			hann
255	6	27,2	13,0			hunn
256	7	42,3	15,8			hann
257	8	33,3	14,6			hunn
258	9	25,5	12,9			hann
259	10	43,4	15,8			hann
260	11	21,0	12,7			hunn
261	12	43,2	15,2			hann
262	13	51,3	15,5			hann
263	14	61,3	18,1			hann
264	15	25,2	12,3			hunn
265	16	52,6	16,9			hann
266	17	55,9	16,8			hann
267	18	52,5	17,5			hann
268	19	28,4	13,7			hann
269	20	24,7	12,9			hann
270	21	31,5	13,8			hann
271	22	61,0	16,9			hann
272	23	58,3	16,8			hann
273	24	49,3	15,5			hann
274	25	52,6	17,2			hann
275	26	51,6	17,3			hann
276	27	57,1	16,8			hann
277	28	62,1	17,2			hann
278	29	55,8	17,8	hann		
279	30	32,9	14,3	hann		
280	31	25,9	12,7	hann		
281	32	23,3	12,8	hann		
282	33	34,5	14,5	hann		
283	34	35,2	14,0	hann		
284	35	26,0	12,9	hann		
285	36	21,7	12,7	hann		
286	37	NRP45	A2	28,3	13,0	hann
287	38			23,0	12,6	hann
288	39			16,2	12,2	hann
289	40			17,2	12,2	hann
290	41			38,0	15,8	hunn
291	42			34,4	14,1	hunn

Tabell D15, fortsettelse.

Totalt antall fisk	Fisk fordelt på gruppe	Gruppe	Kar	Vekt	Lengde	Kjønn
292	43	NRP45	A2	29,8	13,6	hunn
293	44			20,4	11,8	hunn
294	45			16,4	11,3	hunn
295	46			13,7	11,1	hunn
Gjennomsnitt				35,5	14,3	