

# **Atypiske *Vibrio anguillarum*: Karakterisering og virulenstesting på torskeyngel *Gadus morhua*.**



**Mastergradsavhandling i fiskehelse**

**Cecilie Helen Isachsen**



Institutt for Biologi  
Universitetet i Bergen, Norge

Juni 2009

---

*Hemmeligheten med suksess er alltid å ville noe.*

**Benjamin Disraeli**

## TAKK

Denne mastergraden i fiskehelse er utført i perioden august 2008 – mai 2009, ved Biologisk institutt, Universitetet i Bergen, Norge. Forsøkene ble gjennomført ved Havforskningsinstituttet i Bergen, Norge, og var en del av det strategiske institutt programmet "Bacterial challenges in marine aquaculture" (prosjekt nummer 15882/110), er finansiert av norsk forskningsråd.

Profesjonsstudiet i fiskehelse begynner for min del å nærme seg slutten, noe som belyses med denne masteroppgaven. I den forbindelse vil jeg så gjerne få vise min takknemlighet med å takke noen av de som har hjulpet meg i denne prosessen.

Jeg gjerne få starte med å takke mine veiledere Øivind Bergh og Nina Sandlund for utmerket veiledning. Dere har vært til stor støtte i denne prosessen, og bidratt med mange gode råd og innspill. Takk for at dere gav meg denne fantastiske muligheten, og ikke minst for troen dere har hatt i meg. Sammen har dere lært meg utrolig mye!

Jeg ønsker også å takke teknikere, ingeniører og forskere som har gitt meg mye verdifull hjelp; spesielt Ann Cathrine Einen som har bidratt i planlegning av forsøkene, og kommet med mange gode råd underveis, jeg setter stor pris på all din hjelp! Jeg ønsker også å takke Ole Bernt Samuelsen for mange gode diskusjoner, tips og råd. Takk til Hari Rudra og Heidi Kongshaug, som har gitt meg god opplæring og hjelp på laben.

Jeg vil også få vie en stor takk til solstrålene mine på pynten, det har vært en glede å dele kontor med dere. Håper dette var begynnelsen på et godt vennskap og at vi får mange spennende samarbeid i fremtiden!

En stor takk til min familie, og da spesielt min far som gjorde meg kjent med dette studiet og som hele tiden har hatt troen i meg. Sist, men kanskje viktigst, en stor takk til Lars som har vært der for meg og støttet meg gjennom hele prosessen. Takk for alle korrekturlesninger, diskusjoner og gode innspill. Jeg setter utrolig stor pris på din hjelpsomhet og forståelse.

Bergen, 2. juni 2009

Cecilie Helen Isachsen

## FORORD

Oppgaven er skrevet etter retningslinjer fra Diseases of Aquatic Organisms (DAO), med unntak av at teksten er på norsk, det er benyttet komma (,) isteden for punktum (.) i beregninger med tall, og det vil være mellomrom før %, ‰ og °C.

*Oppgaven består av fem hoveddeler og sentral litteratur er benyttet:*

- Introduksjonen gir en kortfattet presentasjon om torskoppdrett i Norge, sykdomsproblematikken med hovedvekt på vibriose og bakterien *Vibrio anguillarum*, samt antibakterielle midler og forbruket av disse i norsk akvakultur.
- Materiale og metoder beskriver biologiske materiale, samt utstyr og metoder som er blitt benyttet i forsøkene.
- Resultatene er beskrevet i fire deler; avsnitt 3.1 presenterer smittedoser i smitteforsøkene, avsnitt 3.2 presenterer resultater i pilotforsøket, avsnitt 3.3 presenterer resultater fra hovedforsøket og punkt 3.4 presenterer resultater i MIC-testen.
- Diskusjonen tolker og kommenterer resultatene. Resultatene blir også sammenlignet med funn fra tidligere forsøk, og eventuelle feilkilder i forsøket blir diskutert.
- Konklusjon og forslag til videre arbeid blir presentert.

Nøkkelord: Virulensstest, badsmitte, interperitoneal (i.p.) injeksjonssmitte, torsk, vibriose, *Vibrio anguillarum*.

## SAMMENDRAG

Atlantisk torsk *Gadus morhua* er en av de viktigste artene i norsk oppdrettsnæring, og produksjonen er stigende. Sykdomsproblemene er betydelige, og blant annet klassisk vibriose (infeksjoner med *Vibrio anguillarum*) forårsaker store tap. Vibriosevaksinene som brukes i dag beskytter ikke tilstrekkelig mot alle stammer av *V. anguillarum*, noe som gjenspeiler behovet for økt kunnskap om sykdommen og bakterien som forårsaker den.

To atypiske isolater av *Vibrio anguillarum* ble virulensstestet med intraperitoneal (i.p.) injeksjonssmitte og badsmitte. I pilotforsøket ble det benyttet fem individer i hvert av de syv forsøkskarene. Testisolatene HI 21413 og HI 21429 ble injisert i tre ulike smittedoser; lavdose, middeldose og høydose på henholdsvis  $10^3$ ,  $10^5$  og  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ . Det ble registrert dødelighet i to av de syv karene. Kar 3 (infisert med HI 21413,  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ ) hadde tre av fem døde fisk, hvor det ble reisolert *V. anguillarum* fra to av de døde fiskene. Kar 5 (infisert med HI 21429,  $10^3$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ ) hadde en død fisk (av fem totalt), ingen *V. anguillarum* ble reisolert fra dette karet.

I hovedforsøket ble fisken badsmittet i 1 time med dose  $10^6$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ . Hver testgruppe bestod av 84-92 individer fordelt på tre replikate kar. Fisk smittet med *V. anguillarum*-stamme HI 610, ble benyttet som positiv kontroll, og usmittet torskkeyngel ble benyttet som negativ kontroll. Testisolatene hadde lavere virulens på torskkeyngel sammenlignet med tidligere resultater fra badsmitteforsøk på plommesecklarver (Sandlund & Bergh 2008). Testisolatene var også lavvirulente sammenlignet med det positive kontrollisolatet HI 610. Torskkeyngel i gruppe 1 (badsmittet med HI21413) og gruppe 2 (badsmittet med HI21429) hadde endelig kumulativ dødelighet på henholdsvis 11 % og 27 % ved forsøksavslutning, dag 26 etter smitte. Kumulativ dødelighet for gruppe 3 (positiv kontroll) og gruppe 4 (negativ kontroll) var henholdsvis 73 % og 11 % ved forsøksavslutning. Ved sekvensanalyse av 16S rRNA- og *GyraseB*-genet til isolater dyrket fra død fisk i hovedforsøket, ble det reisolert *V. anguillarum* fra en fisk badsmittet med HI 610, to fisker badsmittet med HI 21413 og fem fisker badsmittet med HI 21429.

Fire atypiske *V. anguillarum*-isolater; HI 21412, HI 21413, HI 21414 og HI 21429, ble MIC-testet. MIC-verdier ble fastsatt og sammenlignet med tidligere resultater fra lignende forsøk.

## INNHold

<b>1</b>	<b>INTRODUKSJON</b> .....	<b>7</b>
1.1	Oppdrett av torsk .....	7
1.2	Vibrio anguillarum.....	10
1.3	Vibriose.....	12
1.4	Antibakterielle midler .....	14
1.5	Mål med oppgaven.....	18
<b>2</b>	<b>MATERIALE OG METODER</b> .....	<b>19</b>
2.1	Fisk .....	19
2.2	Bakteriestammer .....	20
2.3	Pilotforsøk.....	22
2.4	Hovedforsøk .....	23
2.5	Bakterielle undersøkelser.....	25
2.6	MIC-forsøk.....	31
<b>3</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>33</b>
3.1	Smittedoser .....	33
3.2	Pilotforsøk.....	34
3.3	Hovedforsøk .....	36
3.4	MIC-forsøk.....	41
<b>4</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>42</b>
4.1	Smitteforsøk .....	42
4.2	MIC-test .....	51
<b>5</b>	<b>KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>REFERANSELISTE</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>APPENDIKS</b> .....	<b>64</b>

# 1 INTRODUKSJON

## 1.1 Oppdrett av torsk

Oppdrett av tidlige livsstadier av atlantisk torsk ble utviklet i Norge på 1880-tallet, da kaptein G.M. Dannevig etablerte torskeklekkeri ved Flødevigen forskningsstasjon i Arendal, Norge (Moksness et al. 2004). På 1980-tallet ble produksjonen flyttet til Austevoll forskningsstasjon og dette var starten på masseproduksjon av torsk i Norge (Borthen et al. 2005). Den kommersielle produksjonen av torsk ble for fullt utprøvd i perioden 1990-1993, av BP Nutrition ARC/Salar A/S (Bessaker, Trøndelag) i samarbeid med flere norske forskningsinstitutter (Svåsand et al. 2004).

I flere århundrer har torsk spilt en viktig økonomisk rolle som handelsvare for store fiskerinasjoner som Norge, Island og Canada (Moksness et al. 2004). I 1992 opplevde den østre kysten av Canada et kollaps i torskestammen etter lang tids overfiske (Kurlansky 1999). Det ble samtidig registrert stor nedgang i torskepopulasjonen nordøst i Atlanterhavet (Svåsand et al. 2004), noe som førte til økte priser og mer fokus på kultivering av torsk. Sammen med reduksjon i fangstkvoter har dette bidratt til at torsk har blitt en av de hurtigst voksende oppdrettsartene i Norge. Fiskeridirektoratets statistikk viser at det i 2007 ble solgt ca. 10 375 tonn oppdrettstorsk, en stor økning fra 2002 hvor det ble solgt 248 tonn torsk fra oppdrett (basert på torskeyngel fra klekkerier) (Anonym 2008). I 2008 ble det slaktet 13 500 tonn (rundvekt) torsk i Norge, en økning på nesten 25 % fra året før (Lassen 2008). Til sammenligning var salget av produsert laksefisk (atlantisk laks *Salmo salar*, regnbueørret *Oncorhynchus mykiss* og ørret *Salmo trutta*) i 2007 på 821 700 tonn, en økning på 129 600 tonn fra året før (Anonym 2009d). Disse tallene viser at torskeoppdrett, sammenlignet med oppdrett av laksefisk, enda er i startfasen. Fiskeri- og Kystdepartementet forventer likevel at torsk vil bli en av de viktigste artene i norsk akvakultur (Pedersen 2009).

I tillegg til fokus på oppdrettsfisk, har det vært stor satsing på salg og oppdrett av villfisk. I 2007 ble det solgt 729 tonn (rund vekt) villtorsk, en liten økning fra 2006 hvor det ble solgt 703 tonn (Anonym 2009c).

Den stadig økende produksjonen av torsk har blant annet medført problemer relatert til torskens helse. Sjøvann kan fungere som et medium for både vekst og transport av mikroorganismer, og de bakteriene som vanligvis fremmer sykdom i marin fisk er opportunistiske patogener og er en del av den naturlige mikrofloraen i sjøvann (review av Hansen & Olafsen 1999). I motsetning til salmonider, som er anadrome fisk og tilbringer første del av livet frem til smoltifisering i ferskvann, tilbringer torsken hele livet i et marint miljø. Dette innebærer at torsk er eksponert for marine bakterier gjennom hele livssyklusen, noe som særlig byr på utfordringer for torskelarver med lite utviklet immunforsvar.

Torsk er, sammenlignet med for eksempel salmonider, mindre utviklet ved klekking og har en lengre larveperiode før metamorfose (Pedersen & Falk-Petersen 1992). Under metamorfosen utvikles immunforsvaret gradvis, og torsken er i denne perioden veldig sårbar for bakterielle infeksjoner (Schrøder et al. 1998 Magnadóttir et al. 2005, review av Bricknell et al. 2006). Hos laks og regnbueørret er både hodenyre og thymus utviklet før klekking, og milten er ferdig utviklet ved klekking (Razquin et al. 1990). Studier av den ontogenetiske utviklingen hos atlantisk torsk (Schrøder et al. 1998), viste at fullt utviklede lymfoide organer ikke var til stede før etter metamorfose (49 dager etter klekking). Antall nyre-tubuli og mengden hematopoetisk vev økte med fiskens alder, og celler som uttrykker immunoglobulin M (IgM) ble påvist hos torsk 28 dager etter klekking (14-17mm) (Johannsdóttir et al. 2009). Immunsystemet hos atlantisk torsk skiller seg fra andre undersøkte beinfisk ved å ha en veldig lav økning i nivå av antistoff ved post-immunisering med for eksempel *V. anguillarum* (Espelid 1991, Lund et al. 2006).

Ettersom oppdrettstorsk og villtorsk rammes av mange av de samme bakterielle og virale sykdommene, har sykdomsspredning fra torskeoppdrett til fisken i nærmiljøet lenge vært en utfordring. Det er derfor viktig å skaffe seg kunnskap om hvordan oppdrett av torsk faktisk påvirker miljøet og villfisken. Torsk er latente bærere for en rekke sykdommer, noe som gjør at smittefaren mellom oppdrettsfisk og villfisk er mer sannsynlig. Inntak av villfisk i oppdrett kan derfor by på utfordringer, blant annet knyttet til villfiskens ukjente helsestatus, sykdomshistorie og bærertilstand. Fangst er en stressende prosess for fisken, og kan øke faren for utbrudd.

Rømming har lenge vært et problem i torskeoppdrett, noe som har medført økonomisk tap for oppdretteren og uønsket påvirkning av villfisken i nærmiljøet. Problemer som oppstår



med rømming kan være sykdomsspredning og genetiske påvirkninger av ville torskebestander. Områder hvor det eksisterer spesielt sårbare torskebestander og gytefelt for kysttorsk, bør derfor kartlegges og oppdrett bør legges utenfor slike områder.

Tallene for antall rømt oppdrettstorsk har vært svingende, men generelt høye de siste årene. Per 01.04.09 var det allerede meldt om ca. 39 000 rømte torsk i oppdrett, veldig høye tall sammenlignet med lakseoppdrett som på samme tidspunktet hadde meldt om ca. 6000 rømte individ. Ved sammenligning av antall rømte individ med produksjonstallene for de to artene blir kontrastene tydelige. Rømming av laksefisk er negativt korrelert med produksjon, og antall rømte individ har vært avtagende de siste årene. Samtidig har både produksjon og antall rømninger i torskoppdrett gått opp (se tabell 1, Anonym 2009c).

**Tabell 1:** Fiskeridirektoratets statistikk på antall rømt torsk og laks i oppdrett, i perioden 2004-01.04.2009.

Rømming	2004	2005	2006	2007	2008	Per. 10.04.2009
Torsk	20 000	213 000	290 000	85 000	228 000	39 000
Laks	553 000	715 000	920 000	290 000	100 000	6 000

Studier av genetisk merket oppdrettstorsk har vist at torsk gyter i merdene og at befruktete egg spres ut i det naturlige miljøet (Svåsand et al. 2009). Miljøutfordringer knyttet til økende oppdrett vil derfor være mange. Ettersom et av de største problemene med oppdrett av atlantisk torsk er faren for genetisk påvirkning på villbestandene, er det foreslått å satse på produksjon av steril torsk. Som en del av denne løsningen er det også jobbet med å produsere populasjoner kun bestående av hunnfisk, som kan kombineres med den sterile fisken (Haugen & Taranger 2009). Dette kan løse problemer med befruktning av egg i merdene, og problematikken knyttet til rømming.

## 1.2 *Vibrio anguillarum*

Et kausalt-agens fra sykdommen "rød-pest" i ål *Anguilla anguilla*, ble for første gang isolert av Canestrin i 1893, og isolatet fikk navnet *Bacterium anguillarum* (Austin & Austin 2007). Et lignende tilfelle oppstod blant ål i Sverige i 1907 og *V. anguillarum* ble for første gang offisielt beskrevet som et sykdomspatogen av Bergman i 1909, og allerede i 1911 kunne Bergman rendyrke isolater av *V. anguillarum* fra øye og hjerteblod hos torsk (Bagge & Bagge 1956, review av Samuelsen et al. 2006). Ifølge Bergman kan sykdommen spores tilbake i litteraturen til 1718 (Review av Egidius 1987).

I klassisk taksonomi blir bakterien plassert i slekten *Vibrio*, men på grunnlag av 5S rRNA sekvensanalyse har bakterien senere blitt klassifisert i slekten *Listonella* (MacDonell & Colwell 1985). I dag er både *Vibrio anguillarum* og *Listonella anguillarum* valide artsnavn. Bakterien blir i denne oppgaven omtalt som *Vibrio anguillarum*.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Bergey & Holt 2009) omtaler *V. anguillarum* som en bakterie i familien *Vibrionaceae*, og karakteriseres som andre bakterier innen slekten *Vibrio*, som fenotypiske rette eller bøyde Gram-negative staver med en tykkelse på 0,3 - 1,3 µm og en lengde på 1,4 - 5 µm. Bakterien vokser best mellom 15-37 °C og er avhengig av salt i vekstmediet (Austin & Austin 2007). *V. anguillarum* er fakultativt anaerob og kjemoorganotrof, med både oksidativ og fermentativ metabolisme. Bakterien viser opportunistisk patogenitet mot flere marine fiskearter (Review av Thompson et al. 2004), og som hos de fleste fiskepatogene bakterier så er *V. anguillarum* oksidase-positive. Essensielle virulensmekanismer er den polare flagellen (Milton et al. 1996, Larsen et al. 2004) og ekstracellulære produkter som hemolysin og protease (Inamura et al. 1985, Lamas et al. 1994). Milton et al. (1996) har vist at 40,1 kDa flagelling A (kodet av *flaA* genet) er en av fire subenheter som utgjør flagell-filamentet hos *V. anguillarum*, som er nødvendig for å indusere bevegelse. Tap av dette proteinet vil påvirke bakteriens evne til å infisere fisken. Ved å fjerne en C-terminus fra dette proteinet, resulterer dette i at bakterien får nedsatt virulens.

Binding av jern ved hjelp av sideroforer spiller en betydelig rolle for en rekke fiskepatogener, og for *V. anguillarum* er tilgjengeligheten av jern også viktig i forbindelse med virulens (Larsen & Pedersen 1999). Plasmidet pJM1 er essensielt for transport av jern

og har betydning for virulens hos *V. anguillarum*-serotype 01 og 02 $\alpha$  (Austin & Austin 2007, Bay et al. 2007). Plasmidet sørger for at *V. anguillarum* har et funksjonelt jern-virulenssystem, som er avgjørende for å overkomme vertens uspesifikke forsvarsmekanismer (Stroke et al. 2002, Kado & Helinski 2007).

Det er store serologiske variasjoner innenfor arten *V. anguillarum*, og arten deles derfor inn i undergrupper som kalles serotyper. Serotypingssystemet er basert på påvisning av O-antigen med ulike agglutinerende egenskaper hos ulike stammer av bakterien (Sørensen og Larsen 1986). O-antigenet er en repeterende enhet i lipopolysakkaridene (LPS) som er en del av den ytre membranen hos Gram-negative bakterier. Mer enn 23 serotyper er beskrevet hos *V. anguillarum* (Pedersen et al. 1999), men kun serotype 01, 02 og 03 er assosiert med sykdom hos fisk (Larsen et al. 1994, review av Toranzo et al. 2005, Mikkelsen et al. 2007). Det er i hovedsak serotype 01 som er dominerende hos laksefisk (familie *Salmonidae*), piggvar *Scophthalmus maximus*, multe *Chelon labrosus*, havabbor *Dicentrarchus labrax* og havkaruss *Diplodus puntazzo*, mens serotype 02 dominerer hos torsk. Serotype 03 infiserer hovedsakelig ål og Ayu-fisk *Plecoglossus altivelis* (review av Toranzo et al. 2005).

Den serologiske subgruppen 02 har vist seg å være en heterogen gruppe og deles derfor inn i ytterligere undergrupper kalt 02 $\alpha$  og 02 $\beta$  (Knappskog et al. 1993, Larsen et al. 1994). Det er også funnet *V. anguillarum*-isolater med serotype 02 som gjennom genetiske, biokjemiske og serologiske egenskaper, skiller seg fra både 02 $\alpha$  og 02 $\beta$  (Mikkelsen et al. 2007, Mikkelsen et al. 2008). En ny biotype 02 $\alpha$  II, også kjent som "serotype 02x", blir stadig oftere påvist (Hellberg et al. 2008). I motsetning til salmonider som hovedsakelig blir infisert av serotype 01 og 02 $\alpha$ , er det serotypene 02 $\alpha$ , 02 $\beta$  og 02 $\alpha$  II som vanligvis assosieres med syk torsk, men 02 $\beta$  har i de senere årene vært dominerende (Larsen & Pedersen 1999, Larsen et al. 2004, Mikkelsen et al. 2004, Review av Samuelsen et al. 2006, Lund et al. 2007, Mikkelsen et al. 2008).

Serotyping gir verdifull informasjon om antigenene likheter og ulikheter hos bakterier, noe som er svært viktig ved utvikling av effektive vaksiner (Espelid et al. 1991). I følge Larsen et al. (1994) har serotyping vist seg å være en av de mest pålitelige metodene for karakterisering av *V. anguillarum*-isolater.

### 1.3 Vibriose

Vibriose er tidligere definert som en septikemi som skyldes *Vibrio anguillarum* (Cowell & Grimes 1984, review av Egidius 1987). Taksonomiske oppdateringer har vist at vibriose i dag kan defineres som en gruppe velkjente bakterielle fiskesykdommer som forårsakes av slekten *Vibrio*, og som er registrert i en rekke marine fiskearter. I slekten *Vibrio* er blant annet *Vibrio anguillarum*, *Vibrio fischeri*, (Bergh et al. 2005), *Vibrio salmonicida* (Schrøder et al. 1992), *Vibrio xuii*, *Vibrio ichthyenteri*, *Vibrio chagassi*, *Vibrio aginolyticus*, *Vibrio logei* og *Vibrio splendidus* (Reid et al. 2009) isolert fra torsk.

Sykdommen er påvist hos en rekke ulike fiskearter i det marine miljø, både i oppdrett og i ville populasjoner over hele verden. I Norge har vibriose lenge vært kjent, både hos villfisk og i oppdrett (review av Egidius 1987).

Klassisk vibriose forårsaket av *V. anguillarum*, er i dag en av de mest utbredte torskesykdommene i Norge (review av Samuelsen et al. 2006, Mikkelsen et al. 2008, Hellberg et al. 2008). Bakterien infiserer fisk i alle livsstadier (review av Bricknell et al. 2006), og larver og yngel synes særlig utsatt for vibriose rundt startfôring og ved tilvenning til tørrfôr, mens større torsk rammes i perioder med stigende eller høye sjøvannstemperaturer (Bleie 2002).

En bærekraftig torskeoppdrettsnæring, er på samme måte som i laksenæringen, avhengig av effektiv sykdomskontroll (Rødseth & Tangerås 2002), og torsk i oppdrett blir derfor på et tidlig tidspunkt vaksinert mot de mest patogene serotypene av *V. anguillarum*, serotype O2 $\alpha$  og O2 $\beta$ , samt serotype O1 (Schrøder et al. 2006). Vaksineprodusentene anbefaler badvaksinering, eventuelt dypp av yngel på 0,5 - 1 g, med et gjentatt dypp når yngelen er 2 - 5 g. Når fisken er >30 g anbefales det revaksinering med i.p. injeksjon (Bergh et al. 2005). Til tross for slike vaksinerings rutiner, oppstår det likevel tilfeller med utbrudd av klassisk vibriose på torsk.

For at en vaksine skal virke så effektivt som mulig bør den inneholde beskyttelse mot potensielle patogene agens som er tilstede i miljøet, og i de siste årene har det derfor vært fokusert på nye isolater som bør inkluderes i vibriosevaksinen. Mikkelsen et al. (2007) viste at *V. anguillarum*-isolater fra vaksinert og uvaksinert torsk, i perioden 2002-2005, var forskjellige i biokjemiske, serologiske og genetiske karakteristikk. Det er mulig at

disse bakterielle forskjellene er en viktig årsak til variasjoner i effektiviteten av vaksiner, utbruddshastighet av sykdommen og sykdomsforløpet til torsken. De serologiske variasjonene hos de ulike stammene av *V. anguillarum*, gjenspeiler primært kvalitative forskjeller i sammensetningen av immunogene komponenter i bakteriens yttermembran. Det er disse komponentene som gjenkjennes av fiskens immunsystem og utløser en immunrespons. Dersom vaksinen ikke inneholder de rette serotypene, kan en risikere at vaksinen beskytter mot andre serotyper enn de som forårsaker sykdommen (Rødseth og Tangås 2002).

Adjuvanter (hjelpstoffer) kan også spille en viktig rolle i effektiviteten av vaksinen, og er sannsynligvis nødvendige for å oppnå god effekt og langvarig beskyttelse. Dette har stor betydning for kvantitet og kvalitet på produsert yngel (Rødseth & Tangerås 2002).

Et typisk sykdomsbilde for klassisk vibriose hos ubehandlet torsk er i flere lærebøker, og i smitteforsøk med *V. anguillarum*-stamme HI 610, beskrevet som en akutt hemoragisk septikemi (Samuelsen et al. 2004, Austin & Austin 2007). I en oppdrettssituasjon er dødelighetsforløpet hos fisk med klassisk vibriose oftest annerledes, gjerne med et kronisk, langsomt forløp (pers. kom. Hari Rudra, Havforskningsinstituttet, Bergen, Norge). Etter hvert er det vanlig at den overlevende fisken mister appetitten, blir inaktiv, får mørk hudfarge og oppsvulmede finner (review av Egidius 1987). Finneråte kan observeres (Larsen & Pedersen 1999). Blødninger i hud, spesielt ved finnebasis, gatt og munnregion er ofte fremtredende. På grunnlag av *V. anguillarum*-bakteriens avhengighet for jern, medfører dette at bakterien induserer hemolytisk anemi hos verten. Andre kliniske tegn er blødninger i hoderegionen og rundt øynene (Review av Samuelsen et al. 2006), og i noen tilfeller utvikling av eksoftalmi. I tilfeller der sykdommen er av subakutt karakter er det vanlig med fremtredende og dype ulcerasjoner (ulcerøs hemoragisk septikemi). De hematopoetiske organene blir lysere enn normalt og hemoglobinnivåene synker (Austin & Austin 2007). Sykdommen kan også forekomme i kronisk tilstand der kliniske tegn blir mer fremtredende.

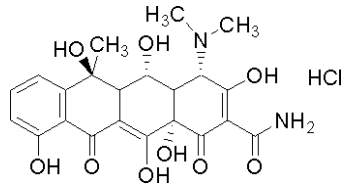
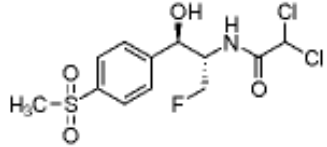
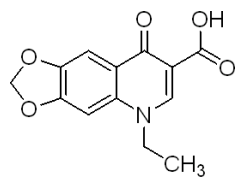
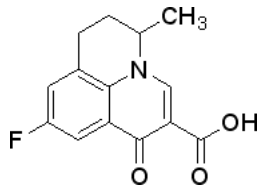
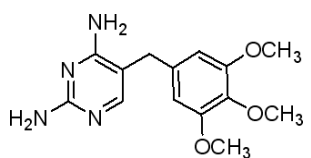
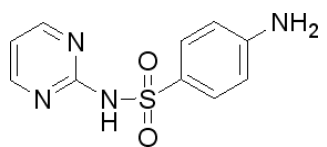
## 1.4 Antibakterielle midler

Bakterieinfeksjoner i fiskeoppdrett kan behandles med antibakterielle midler (antibiotika og kjemoterapeutika). Det er imidlertid utviklet vaksiner mot noen av de viktigste bakterieinfeksjonene vi har på torsk i dag. Til tross for dette oppstår det stadig bakterielle sykdommer hos vaksinert fisk. I de senere årene har norsk oppdrettsnæring hovedsakelig benyttet følgende antibakterielle midler i behandling av fisk: oksytetrasyklin, florfenikol, flumekvin, oksolinsyre og sulfadiazin/trimetoprim (Martinsen et al. 1992, Anonym 2009b) (tabell 2). Kinolonene oksolinsyre og flumekvin er blant de mest brukte antibakterielle midlene i fiskeoppdrett da de gir høy beskyttelse mot Gram-negativ bakterier.

Effekten av antibiotikabehandling av bakterieinfisert fisk i ferskvann og sjøvann er svært forskjellig, da sjøvannet inneholder store mengder kationer som binder seg til antibakterielle midler som oksytetrasyklin, oksolinsyre og flumekvin (review av Samuelsen et al. 2006), og påvirker fiskens opptaksevne av midlene (Lunestad & Goksøy 1990).

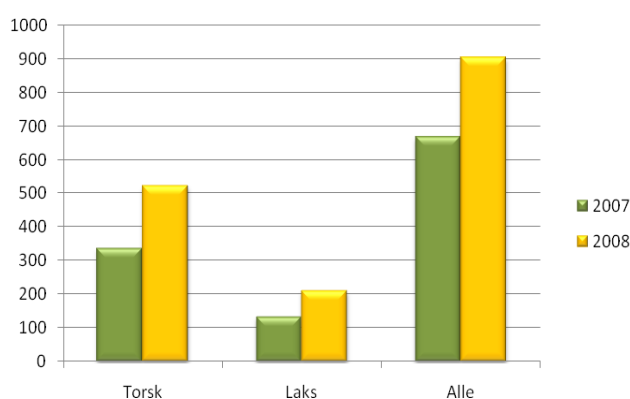
Oral administrering, først og fremst via pellet (Grave et al. 1990), er en sikker og effektiv måte å behandle store mengder fisk, uten å forårsake unødvendig stress. Ettersom tap av appetitt er vanlig hos fisk som lider av bakterielle infeksjoner, vil imidlertid oral administrasjon av medisinfôr i stor grad bli tilført den uinfiserte fisken og behandlingen vil i slike tilfeller ha en profylaktisk virkning i stede for terapeutisk (review av Samuelsen et al. 2006). Intraperitoneal (i.p) og intramuskulær (i.m.) injeksjonsbehandling kan også benyttes. Metoden virker derimot ofte stressende på fisken, og er tidkrevende. Denne behandlingen er derfor hovedsakelig brukt i spesielle tilfeller, som ved behandling av verdifull stamfisk. En alternativ metode er badebehandling i kar, tilsatt medikamentet. Dette er vesentlig mindre arbeidsintensivt, og vil virke mindre stressende på fisken. Di- og trivalente kationer, hovedsaklig kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) og magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), i sjøvannet binder seg likevel til de overnevnte antibakterielle midlene. Dette er en behandlingsmetode egnet for lavere volum med fisk og små fisk.

**Tabell 2:** Antibakterielle midler, deres virkemekanisme og molekylærstruktur. Molekylærstruktur er hentet fra Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/home.html>)

<b>Antibakterielle midler</b>	<b>Virkemekanisme</b>	<b>Molekylærstruktur</b>
<u>Proteinsyntese hemmere</u>		
Oksytetrasyklin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bakteriostatisk effekt</li> <li>- Bredspektret antibiotikum</li> </ul>	
Florfenikol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bakteriostatisk effekt</li> <li>- Syntetisk antibiotikum</li> <li>- Bredspektret</li> </ul>	
<u>DNA-gyrase hemmere</u>		
Oksolinsyre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- God effekt mot sensitive bakterier</li> <li>- Kjemoterapeutikum</li> <li>- Baktericid effekt</li> <li>- Bredspektret</li> </ul>	
Flumekvin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- God effekt mot sensitive bakterier</li> <li>- Kjemoterapeutikum</li> <li>- Baktericid effekt</li> <li>- Bredspektret</li> </ul>	
<u>Folatantagonister:</u>		
Trimetoprim	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kjemoterapeutikum</li> <li>- Hemmer folinsyntesen</li> <li>- Bredspektret</li> </ul>	
Sulfadiazine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kjemoterapeutikum</li> <li>- Hemmer folinsyntesen</li> <li>- Bredspektret</li> <li>- Sulfadiazin + trimetoprim kalles Tribriksen</li> </ul>	

### 1.4.1 Forbruk av antibakterielle midler i norsk torskoppdrett

Ved introduksjon av nye oppdrettsarter i intensiv akvakultur kan det, ut fra tidligere erfaringer, forventes å bli introdusert nye bakterielle og virale sykdommer (Bergh 2002, Vadstein et al. 2004, Schrøder et al. 2006). I startfasen av lakseproduksjonen, på slutten av 1970-tallet og frem til 1990, opplevde den norske oppdrettsnæringen store tap, spesielt på grunn av bakterielle sykdommer som atypisk furunkulose, klassisk vibriose og kaldtvannsvibriose (review av Sommerset et al. 2005). Det årlige forbruket av antibakterielle midler nådde en topp i 1987 med ca. 48 570 kg (Lillehaug et al. 2003). Gjennom utvikling av effektive vaksiner og bedre implementering av sykdomsforebyggende tiltak hos laksefisk, er forbruket i dag betraktelig redusert, og i følge Mattilsynets reseptdatabase var totalforbruket (torsk, laks, ørret, kveite *Hippoglossus hippoglossus*, piggvar) i 2008 på 905 kg (figur 1, Anonym 2009a). For perioden 2000 - 2007 viser reseptbasert statistikk fra Mattilsynet at salg av antibakterielle midler i økende grad har gått til behandling av nye oppdrettsarter, spesielt torsk. Ved å sammenligne Fiskeridirektoratets data for torskproduksjon og Mattilsynets data for antibakterielt forbruk, er økningen i forbruket til torsk for perioden 2000 - 2006 positivt korrelert til økningen i biomasse torsk produsert, det relative forbruket har derimot avtatt i 2007 og 2008. I 2008 ble det brukt 523 kg antibiotika i torskoppdrett, en liten økning i forbruk på 186 kg fra året før. Det totale forbruket for laksefisk det samme året var 211 kg.



**Figur 1:** Rekvirerte mengder antibiotika (kg virkestoff) pr. fiskeoppdrettsart i 2007 og 2008. Figur er modifisert fra data hentet fra Mattilsynets reseptdatabase, basert på resepter rapportert fra rekvirent og utleverer.

Blant de fem mest brukte antibakterielle midlene benyttet i oppdrettsnæringen, er oksolinsyre det mest brukte, etterfulgt av florfenikol. Flumekvin er i 2008 det minst brukte antibakterielle middelet (Anonym 2009b).



#### **1.4.2 Minimum inhibitory concentration (MIC)**

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) defineres som den laveste konsentrasjon av antibiotika, uttrykt i  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , som innen bestemte forsøksbetingelser og tidsrom, hindrer synlig vekst av en bakteriestamme (Andrews 2001). For å kunne behandle fisk infisert med klassisk vibriose, så tidlig og optimalt som mulig, er det viktig å gjøre grundig forarbeid for å kartlegge patogene bakterier og deres MIC-verdier for antibakterielle midler. MIC-test kan også benyttes til å avdekke eventuell resistens mot antibakterielle midler. Overvåking av antibiotikaresistens er en viktig del av diagnostikken ved sykdomsoppklaring og en viktig del av Veterinærinstituttets overvåking av norsk fiske- og dyrehelse. Det ble påvist isolater av *V. anguillarum*, serotype O2 $\beta$ , med nedsatt følsomhet for oksolinsyre, på til sammen ni lokaliteter i 2007 (Hellberg et al. 2007) og to lokaliteter i 2008 (Hellberg et al. 2008).

Forskere og spesialister på fiske sykdommer har i de siste årene hatt store uenigheter om hvordan en standardisert metode for å MIC-teste bakterier fra det marine miljøet bør settes opp. Clinical and laboratory standards institute (CLSI) har anbefalt tre standardiserte metoder for å teste bakterier fra mammalier; agar-disk spredning (agar disk diffusion), broth løsning og agarløsning (Miller et al 2005). Dette er metoder som med diverse tilpasninger også benyttes på fiskepatogene bakterier. En rekke studier har gitt nyttig informasjon for å avgjøre den mest optimale vekstraten, inkuberingstid og temperatur, samt passende antibakterielle midler. Review-artikkelen til Smith (2006) gir oversikt av de mest brukte metodene i MIC-testing på fiskepatogene bakterier.

## 1.5 Mål med oppgaven

*V. anguillarum*-stammene HI 21412, HI 21413, HI 21414 og HI 21429 ble i Sandlund & Bergh (2008) virulenstestet på plommesekkklarver av torsk. Bakteriene ble i dette forsøket klassifisert som primær-patogener med en negativ effekt på overlevelse hos plommesekkklarver av torsk, og høy dødelighet ble registrert. Virulens ovenfor større fisk var derimot ikke studert, og etter som plommesekkklarver er immunologisk og ongenetisk ulik yngel, var det umulig å vite hvordan stammene påvirker større fisk. Forsøkene hadde derfor følgende mål:

- Pilotforsøk: Virulensteste isolatene (HI 21413 og HI 21429) med ulike doser ved hjelp av i.p. injeksjon på torskeyngel, for å fastsette passende smittedose til et badsmitteforsøk (hovedforsøket).
- Hovedforsøk: Virulensteste isolatene (HI 21413 og HI 2142, samt kontrollisolat HI 610) med badsmitte på torskeyngel, og studere bakterienes evne til å fremkalle kliniske tegn.
- MIC-Test: MIC-teste de atypiske *V. anguillarum*-stammene; HI 21412, HI 21413, HI 21414 og HI 21429, samt kontrollisolat ATCC 33658, med følgende antibakterielle midler; oksolinsyre, florfenikol, oksytetrasyklin, flumekvin og trimetoprim/sulfadiazine, for å fastslå MIC-verdier, samt avdekke bakteriens følsomhet, sammenlignet med andre *V. anguillarum*-stammer, for de antibakterielle midlene.

## 2 MATERIALE OG METODER

### 2.1 Fisk

Uvaksinert torsk (700 stk) med gjennomsnittsvekt 8 - 10 g, ble levert av forskningsstasjonen i Parisvatnet (Øygarden, Norge). Fisken ble levert til Havforskningsinstituttets laboratorier i Bergen, Norge, 02. juli, hvor den ble oppbevart i 400 liters kar med sirkulerende sjøvann. Temperaturen i vannet var  $9,3 \pm 0,5$  °C og saliniteten var 34,5 ‰. Gjennomstrømsraten på vannet var 500 liter per time. Vannet ble sjekket med jevne mellomrom, og den totale gassmetningen (TGM) i vannet var ca. 763 mbar, barometertrykket var 759 mbar og oksygeninnholdet var på  $9,4 \text{ mg l}^{-1}$  (98 %). Nitrogen og argon innholdet i karene ble registrert til  $14,86 \text{ mg l}^{-1}$  (99,8 %).

Fisken ble fôret etter appetitt med fôrtype Gemma Diamond 1,5 (startfôr til torskefisk), levert av Skretting (Stavanger, Norge). I forkant av smitteforsøket, 07. juli, ble det registrert høy dødelighet blant torskeyngelen. Fisken viste tydelige tegn til sykdom, hvor den virket inaktiv og hadde redusert appetitt, noe som er vanlig for uvaksinert torsk (Hari Rudra, Havforskningsinstituttet, pers. kom.). Fisken ble behandlet med medisinfôr som inneholdt oksolinsyre med dosering  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  fisk, i 10 påfølgende dager. Behandling ble avsluttet 17. juli. Ved forsøksstart 25. august (pilotforsøk) og 26. september (hovedforsøk), ble fisken overført til 220 liters kar. Forholdene i de forskjellige karene ble satt opp så identisk som mulig ved å gi fisken samme kartype, vannkilde, salinitet, lysregime og temperatur. Gjennomstrøms hastigheten på vannet var 250 liter per time. Fisken ble i forkant av smitteforsøkene sultet i 24 timer.

Den overlevende fisken ble ved forsøksavslutning avlivet med en overdose Benzocain ( $0,6 \text{ ml l}^{-1}$  vann). Det eksperimentelle oppsettet ble godkjent av forsøksdyrutvalget.

## 2.2 Bakteriestammer

Bakterieisolatene som ble benyttet i dette forsøket er *V. anguillarum*-isolatene HI 21412, HI 21413, HI 21414 og HI 21429, opprinnelig isolert fra syke torskelarver (Sandlund & Bergh 2008) og *V. anguillarum*-stamme HI 610, serotype O2 $\alpha$ , isolert fra vibriose-infisert torskeyngel fra Parisvatnet. Det sistnevnte isolatet ble brukt som positiv kontroll i hovedsmitteforsøket. I MIC-testen ble *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 (ATCC= American Type Culture Collection) benyttet som kontrollisolat. Alle de nevnte isolatene finnes i bakterieisolatsamlingen til Havforskningsinstituttet i Bergen.

### 2.2.1 Oppbevaring av bakterieisolater

Isolatene ble inokulert i fryserør med 0,8 ml Marine Broth (MB) (Difco 2216, Difco, Detroit, MI, USA), og inkubert i risteinkubator (Infors HT Minitron, infors AG, Bottmingen, Sveits) ved 12 °C i 48 timer, med moderat risting på 80 rpm (rounds per minute). Etter inkubering ble hvert rør tilsatt 0,2 ml glyserol (87 %) og vortekset. Bakterieisolatene ble deretter oppbevart i frys ved - 80 °C. Dette er standard prosedyre for oppbevaring av bakteriologisk materiale på molekylærbiologisk laboratorium ved Havforskningsinstituttet i Bergen. For mellomtids lagring (1 - 4 dager) ble petriskåler med kolonier pakket i plast og oppbevart i kjøleskap ved 4 - 5 °C.

### 2.2.2 Kultivering av bakterieisolater

Ved dyrking av så store mengder *V. anguillarum*-bakterier som var nødvendig til badsmitteforsøket, ble det først laget en forkultur. Ca 10  $\mu$ l nedfrossen bakteriekultur ble platet ut på Petriskål med vekstmedium Marine Agar (MA) (Difco2216, Difco, Detroit, MI, USA). Skålen ble inkubert ved 15 °C i 48 - 72 timer, til det ble observert god vekst. Kolonier fra Petriskålene ble overført til flytende vekstmedium ved å rulle en vattpinne over koloniene, og deretter røre pinnen godt i en 100 ml ErlenMeyer kolbe inneholdende 50 ml MB. Kolben ble deretter inkubert i risteinkubator med moderat risting (80 rpm), ved 12 °C i 48 timer. Hovedkulturen ble deretter tilberedt ved å tilsette forkulturen (50 ml) i 700 ml MB. Hovedkulturen ble igjen inkubert i ved 12 °C 48 timer, med moderat risting (80 rpm). Den samme kultiveringsprosedyren ble fulgt i pilotforsøket, men med et mindre volum på 25 ml, samt vasking av isolater før i.p. injeksjon. Ved vasking ble 25 ml bakteriekultur sentrifugert (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Tyskland) på 4000 rpm ved 4 °C, i 10

min. Supernatanten ble fjernet og kulturen ble resuspendert i 25 ml autoklavert sjøvann (80 %). Denne prosedyren ble gjentatt 3 ganger.

*A. salmonicida*-stamme ATCC 33658 ble inkubert i vekstmedium Mueller Hinton Broth (MHB) (2 % NaCl) ved 22 °C, i 48 timer (uten risting).

### 2.2.3 Celletall i vekstmedium

Visuelle studier av bakteriesuspensjonen i mikroskop viste at bakteriene var stavformet og bevegelige, dette verifiserte at bakterien var i live før smitte av torskeyngelen. For å anslå bakterietettheten i smittekulturen ble det benyttet to metoder; telling av totaltall og kimtallbestemmelse.

Totaltall kan defineres som det totale bakterietallet som kan telles fra en fortynnet kultur i tellekammer, dette omfatter levende og døde celler. For å beregne totaltallet ble det laget en 10-folds (1:10) fortynningsserie av 1 ml hovedkultur i 80 % sterilt sjøvann. Totaltall ble beregnet i mikroskop (Leitz Dialux 20, Wetzlar, Tyskland) ved hjelp av tellekammer (Helber Chamber C.A. Hausser & son, Phila., U.S.A.). Fortynningsserien ble etter tre tellinger vasket, for fjerning av grums og evt. døde celler, før ny telling. Gjennomsnittstallet etter tellingene ble beregnet og gav estimert celletall  $\text{ml}^{-1}$  i hovedkulturen, som deretter ble justert til ønsket smittedose.

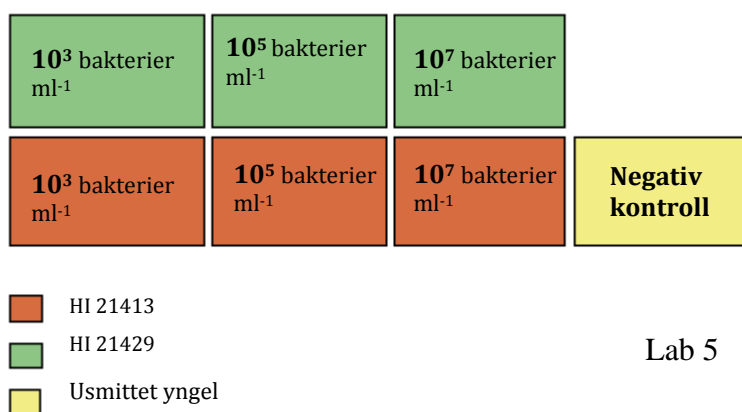
For å verifisere resultatene fra telling av totaltall, ble det også beregnet kimtall. Kimtall kan defineres som antallet bakterier i en prøve som kan vokse opp til en tellbar koloni på et gitt vekstmedium og ved gitte vekstbetingelser (CFU= colony forming units).

For å estimere kimtall, ble 100  $\mu\text{l}$  bakteriesuspensjon fra en  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  fortynningsserie platet ut en på Petriskåler med 17 ml MA. Det ble laget tre replikate skåler per fortynning. Petriskålene ble inkubert (Termaks series 6000, Termaks, Bergen, Norge) ved 15 °C. Etter 48 timer ble et gjennomsnittlig kimtall, for de tre replikate skålene i hver fortynning bestemt.

## 2.3 Pilotforsøk

Pilotforsøket ble satt opp for å bestemme passende smittedose til badsmitteforsøket. I.p. injeksjonssmitte ble benyttet i dette studiet. Metoden er basert på virulenstester tidligere benyttet av Toranzo et al. (1983), Pazos et al. (1993) og Elston et al. (1995). *V. anguillarum*-isolatene HI 21413 og HI 21429 ble virulenstestet på torskeyngel. Pilotforsøket foregikk i perioden 26. august – 20. september 2008.

Ved forsøksstart ble fisken tilfeldig fordelt i syv kar. Hver gruppe bestod av 5 individer med gjennomsnittsvekt på  $13 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$ . Forsøksfisken ble bedøvet i en metomidat ( $1 \text{ ml l}^{-1}$ ) / benzokain ( $0,25 \text{ ml l}^{-1}$ ) løsning, og deretter i.p. injisert med  $200 \text{ } \mu\text{l}$  bakteriesuspensjon. Kar 1, 2 og 3 inneholdt fisk som ble injisert med *V. anguillarum*-stamme HI 21413 i tre ulike smittedoser; lavdose, middeldose og høydose, henholdsvis dosert med  $10^3$ ,  $10^5$  og  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ . Kar 4 bestod av negativ kontrollfisk som ble i.p. injisert med  $200 \text{ } \mu\text{l}$  autoklavert sjøvann (80 %). Fisken i kar 5, 6 og 7 ble injisert med *V. anguillarum*-stamme HI 21429, i tre ulike smittedoser; lavdose, middeldose og høydose, henholdsvis dosert med  $10^3$ ,  $10^5$  og  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ , se karoppsett i figur 2. Ved forsøksstart var temperaturen i vannet  $9 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ , på dag 8 etter smitte ble temperaturen hevet til  $13 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ .



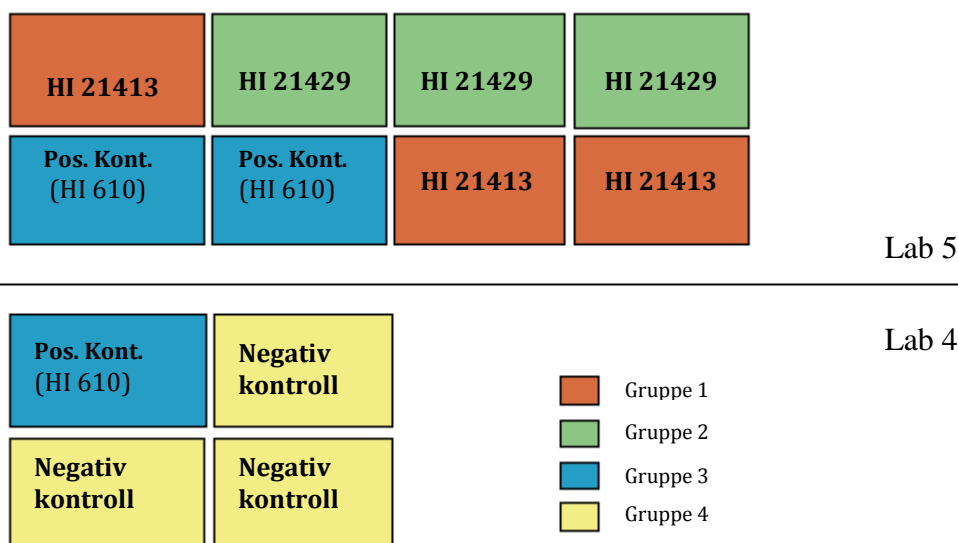
**Figur 2:** Karoppsett i pilotforsøk med torsk, intraperitonealt injisert med HI 21413 og HI 21429, med tre ulike doser;  $10^3$ ,  $10^5$  og  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ , samt en negativ kontroll.

## 2.4 Hovedforsøk

Forsøksoppsettet er basert på tidligere studier av Samuelsen & Bergh, (2004), Vik-Mo et al. (2005) og Seljestokken et al. (2006) hvor *V. anguillarum*-stamme HI 610 ble brukt som testisolat. *V. anguillarum*-isolatene HI 21413 og HI 21429 ble i dette forsøket virulenstestet på torskeyngel. Det høyvirulente *V. anguillarum*-isolatet HI 610 (serotype O2 $\alpha$ ) ble benyttet som positiv kontroll. Smitteforsøket foregikk i perioden 26. september – 22. oktober 2008.

### 2.4.1 Smitteforsøk

Ved forsøksstart ble fisken tilfeldig fordelt i fire grupper. Gruppe 1 og gruppe 2 bestod av forsøksfisk som ble badsmittet med *V. anguillarum*-isolatene HI 21413 og HI 21429. Gruppe 3 bestod av kontrollfisk infisert med *V. anguillarum* HI 610 (positiv kontroll), og gruppe 4 bestod av usmittet yngel (negativ kontroll), se karoppsett i figur 3.



**Figur 3:** Karoppsett i smitteforsøket med torskeyngel. Gruppe 1; Badsmittet med HI 21413, Gruppe 2; Badsmittet med HI 21429, Gruppe 3; Positiv kontroll (badsmittet med HI 610), Gruppe 4; negativ kontroll (usmittet torskeyngel).

Hver gruppe bestod av 84 - 92 individer, med en gjennomsnittsvekt på  $15 \pm 5$  g, fordelt på tre replikate kar, se tabell 3 for antall individ i hvert kar og det totale antallet individ i hver gruppe.

**Tabell 3:** Antall individer i hvert kar for gruppe 1 (smittet med HI 21413), gruppe 2 (smittet med HI 21429), gruppe 3 (smittet med HI 610) og gruppe 4 (usmittet kontroll), samt totaltall for hver av gruppe.

Gruppe:	Antall individ, kar 1	Antall individ, kar 2	Antall individ, kar 3	Totalt antall individ pr. gruppe
Gr. 1	30	29	25	84
Gr. 2	30	29	29	88
Gr. 3	30	30	32	92
Gr. 4	30	30	30	90

Den samme dagen fisken skulle eksponeres for smitteisolat, ble vanntemperaturen hevet fra 9 °C til 12 °C. Dette ble gjort for å øke stressnivået til fisken. For å stresse fisken ytterligere, samt å redusere mengden tilført bakteriesuspensjon, ble vanntilførselen til karene stoppet og vannivået senket til 50 liter. Bakteriesuspensjonen (500 ml) som ble tilsatt karene hadde en celletetthet på  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$  (registrert i tellekammer og senere bekreftet ved kimtallbestemmelse), konsentrasjonen av bakterier i karene ble da antatt å være ca.  $10^6$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ . Fisken ble badsmittet i 1 time, etter protokoll fra Seljestokken et al. (2006) og sjøvannet ble under smitte luftet via kolonnenluffer. Etter 1 time ble karene tilbakeført normal vannstand (220 l) og bakteriesuspensjonen ble langsomt vasket ut.

#### 2.4.2 Statistisk analyse

Analyse av datamaterialet i hovedforsøket ble utført ved hjelp av Microsoft Office Excel 2007 elektronisk regneark og Statistica 8.0 StatSoft Inc.

G-test ( $p < 0,05$ ) er en statistisk analyse som fastslår om det er signifikant ulikhet mellom to eller flere grupper. I hovedforsøket ble G-test for uavhengighet brukt for å fastslå signifikante avvik mellom de replikate karene i hver behandlings gruppe (Fowler & Choen 1997). Dødelighetsdata for kar, uten signifikant avvik, ble slått sammen og behandlet som en gruppe.

For å sammenligne dødelighet for de fire forsøksgruppene, ble 2 x 2 kontingenstabell ( $p < 0,05$ , "frihetsgrader" (df) = 1), utført i Statistica 8.0 StatSoft Inc benyttet. Det ble brukt Yates-corrected Chi-square ( $\chi^2$ ) for å måle om det var signifikante forskjeller i dødelighet mellom de fire gruppene. Yates correction er anbefalt når df tilsvare 1 og når det jobbes med få antall prøver (Fowler & Cohen 1997). Denne metoden skiller seg fra en vanlig G-test ved at det ikke tas hensyn til forventet frekvens, men kun kalkulerer med observerte frekvenser.



## 2.5 Bakterielle undersøkelser

I pilotforsøk og hovedforsøk ble det tatt ut bakterielle prøver fra hud, muskel, hodenyre og milt. Det bakterielle materialet ble analysert ved hjelp av ulike mikrobiologiske og molekylærbiologiske metoder.

### 2.5.1 Mikrobiologisk analyse

Død fisk som ble registrert før forsøksstart, under forsøket og fisk avlivet ved avslutning av hovedforsøket, ble grundig undersøkt for ytre og indre patologiske tegn. Det ble tatt mikrobielle prøver fra hud, muskel, milt og hodenyre. Like etter at fisken ble fjernet fra karet ble det tatt hudprøver ved hjelp av vattpinner som ble ført over fiskens hud og deretter overført til agarskål. Huden ble så fjernet med en steril skalpell og prøver fra muskulatur ble tatt ved hjelp av vattpinner. For å unngå kontaminering av prøver fra milt, ble milten delt i to ved hjelp av steril pinsett og skalpell, og deretter "stemplett" på agarskålen. Prøver fra hodenyre ble tatt ved hjelp av en steril podenål. Nyrematerialet ble fordelt på agarskåler med vekstmedium MA, Blodagar (BA) med 15 % saueblod og 15 % NaCl, samt Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS) (Merck KGaA, Darmstrad, Germany), som er et selektivt medium for isolering og kvantifisering av *Vibrio spp.* Alle skålene ble inkubert ved 15 °C i 48 - 72 timer. Kolonimorfologi på skålene ble avlest og sammenlignet med kolonier fra testisolatene HI 21413, HI 21429 og HI 610. Resultatene ble også sammenlignet med tidligere resultater fra studier gjennomført av Sandlund & Bergh (2008).

### 2.5.2 Mono-Va agglutinasjons-kit mot *Vibrio anguillarum*

For å sikre at det ikke var krysskontaminering eller naturlig opphav av *V. anguillarum* i forsøksoppsettet, ble ca 50 % av isolatene som ble isolert fra død fisk i gruppe 1, gruppe 2 og gruppe 4, testet ved hjelp av Mono-Va agglutinasjons-kit (Bionor A/S, Skien, Norge) for identifisering. Forsøksoppsettet ble fulgt etter bruksanvisning fra produsent.

### 2.5.3 Genotyping

Forsøksoppsettet på genotyping av *V. anguillarum* er basert på tidligere studier utført av Sandlund & Bergh (2008).

DNA isolering:

Ved hjelp av DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland), ble genomisk DNA isolert fra 1 ml bakteriekultur i vekstmedium. Protokoll vedlagt i Qiagen-kit for Gram-negative bakterier ble benyttet, og er nærmere beskrevet under punkt 1 - 5.

1. Bakteriestammene ble inokulert i 1 ml Tryptone Soya Broth (TSB) (Difco laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) i multibrønnebrett (Nunc, Roskilde, Danmark). Bakteriene ble inkubert ved 12 °C i 48 timer, med moderat risting (80 rpm). Bakteriesuspensjonen ble deretter justert til å inneholde  $10^9$  celler  $\text{ml}^{-1}$ . Bakteriestammene ble høstet fra multibrønnebrettet etter sentrifugering i 10 min ved 4000 rpm. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 180  $\mu\text{l}$  ALT buffer.
2. Bakteriene ble tilsatt 20  $\mu\text{l}$  proteinase K og vortekset, før inkubering ved 56 °C til fullstendig lysis av bakterien (over natt). Løsningen ble så vortekset i 15 sekunder før tilsetning av 200  $\mu\text{l}$  AL buffer. Løsningen ble så vortekset nok en gang.
3. Løsningen ble deretter tilsatt 200  $\mu\text{l}$  etanol (96 - 100 %) og vortekset. Miksturen ble dernest pipettert ut og overført til et DNeasy Mini spin brett, som var plassert over et brett med 2 ml oppsamlingsrør. Brettet med prøvene ble sentrifugert i 4000 rpm i 2 min.
4. DNeasy Mini spin brettet ble deretter plassert på et nytt brett med 2 ml oppsamlingsrør og tilsatt 500  $\mu\text{l}$  AW1 buffer. Brettet ble igjen sentrifugert i 2 min (4000 rpm). Oppsamlingsrør ble fylt med avfallbuffer. Den samme prosedyren ble gjennomført ved tilsetning av 500  $\mu\text{l}$  AW2 buffer.
5. DNeasy Mini spin brettet ble plassert i et rent brett med 2 ml mikrosentrifugerør, hvor det ble pipettert 200  $\mu\text{l}$  AE buffer direkte på DNeasy membranen. Brettet ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt, og deretter sentrifugert i 2 min (4000 rpm). DNAét blir på denne måten eluert ut av membranen og ned i mikrosentrifugerørene.

PCR (Polymerase Chain Reaction) av 16S rRNA gen og GyraseB (Gyr B)-gen:

Universale primere 27f (5' -AGA GTT TGA TC(A:C) TGG CTC AG-3') og 1492r (5' -TAC GG(C:T) TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (*Escherichia coli* nummerering) (Weisburg et al. 1991), ble brukt for 16S rDNA analyse. For analyse av *GyrB*-genet ble det brukt primer GyrB-1(5' -GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA-3') og GyrB-2 (5' AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT-3') (Yamamoto & Harayama 1995). Innholdet i PCR-reaksjonen er nærmere beskrevet i tabell 4.

**Tabell 4.** Innhold i PCR-reaksjonen for 16S rRNA- og *GyrB*-gen

Reagens	16S rDNA (Mengde, $\mu$ l)	<i>GyrB</i> (Mengde, $\mu$ l)
PCR buffer (5x)	4,0	4,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2	1,5
dNTP (1,25 mM pr. primer. Promega, Madison, Wisconsin)	3,2	4,0
Forward primer, 27f (10 $\mu$ M)	1,0	-
Reverse primer, 1492r (10 $\mu$ M)	1,0	-
Forward primer, GyrB-1 (10 $\mu$ M)	-	1,0
Reverse primer, GyrB-2 (10 $\mu$ M)	-	1,0
Taq polymerase (5U/ $\mu$ l, Promega)	0,2	0,5
Nuclease fritt vann (Eppendorf, Hamburg, Tyskland)	5,4	4,0
Templat	4,0	4,0
Totalt	20	20

Prøvene ble plassert i en GeneAmp 9700 PCR maskin (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) hvor amplifikasjonsprosessen bestod av 30 sykluser for 16S rRNA-genet og 35 sykluser for *GyrB*-genet. Protokollen fra Havforskningsinstituttet, som ble benyttet i forsøket, er tidligere blitt optimalisert i forhold til de genene som ble studert. Alle PCR-reaksjonene ble utført i 0,2 ml reaksjons rør (Axygen Scientific, Union City, CA, U.S.A.). De ulike stegene i PCR-prosessen er nærmere beskrevet i tabell 5 og tabell 6.

**Tabell 5.** PCR reaksjon for 16S rRNA-gen.

30 sykluser	PCR					
	Hold	Denature	Anneal	Extend	Extend/hold	Hold
Temp.	95 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Tid	5 min	1 min	1 min	1 min	10 min	$\infty$
Volum	20 $\mu$ l					

**Tabell 6.** PCR reaksjon *GyrB*- gen.

35 sykluser	PCR					
	Hold	Denature	Anneal	Extend	Extend/hold	Hold
Temp.	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Tid	5 min	1 min	1 min	2 min	7 min	$\infty$
Volum	20 $\mu$ l					

#### DNA elektroforese:

For å fastslå at det var PCR-produkt tilstede etter PCR-reaksjonen ble det benyttet ferdig agarose-gel som inneholdt etidiumbromid, for DNA elektroforese (E-Gel, 96 Gels, Invitrogen, Carlsbad, California). Agarose-gelen ble tilsatt en løsning med 5  $\mu$ l PCR-produkt og 15  $\mu$ l destillert vann i hver brønn. For å måle størrelsen på produktet ble det

tilsatt en markør (TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder) i to brønner som kontroll. Den ferdige gelen med PCR-prøvene ble plassert på elektrodekontakter på Mother E-base (Invitrogen), prosessen tok 12 minutter. Gelen ble deretter digitalt fotografert i UV transilluminator (Gene Genios-Bio imaging system fra Syngene, Cambridge, England).

#### DNA pre-sekvensering:

PCR-produktet ble forberedt til sekvensering ved hjelp av et pre-sekvenserings kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio). Denne prosessen fjernet dNTP og primere som var til overs i PCR-produktet. Reagensene ble plassert i en PCR-maskin for inkubering ved 37 °C i 15 minutter, etterfulgt av inkubering i 80 °C i 15 min (deretter "hold" i 4 °C). Reagensene i pre-sekvenseringen er beskrevet i tabell 7.

**Tabell 7.** Reagenser i pre-sekvensering.

<b>Reagens</b>	<b>16S rRNA-gen (Menge, µl)</b>	<b>GyrB-gen (Menge, µl)</b>
PCR-produkt	5,0	5,0
Exonuclease 1 (10,0 U µl <sup>-1</sup> )	1,0	1,0
Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, (2,0 U/ µl)	1,0	1,0
<b>Totalt</b>	<b>7,0</b>	<b>7,0</b>

#### Sekvenseringsreaksjon:

Nukleotidsekvensen av det oppkopierte bakterielle 16S rRNA- og *GyrB*-genene ble sekvensert som tidligere beskrevet av Sanger et al. (1977). Både "forward" og "reverse" primere ble benyttet for å sekvensere genene i begge retninger, for å få en overlappende og dermed lengre sekvens. Primere brukt til 16S rDNA analyse var de samme som ved PCR amplifikasjonene; 27f (forward) og 1492r (reverse). For *GyrB*-genet ble det benyttet andre primere i sekvenseringsreaksjonen; GyrB-1s (5'- GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA -3') (forward) og GyrB-2s (5' AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CC -3') (reverse) (Yamamoto & Harayama 1995). Sekvenseringsreaksjonen ble gjennomført i en PCR-maskin og bestod av 25 sykluser. Se tabell 8 og 9 for nærmere detaljer om reagenser og amplifiseringsprosessen.

**Tabell 8.** Reagenser i amplifiseringsprosessen.

Reagens	Mengde, $\mu$ l
Big Dye 3,1 (2,5x, Applied Biosystems, Foster City, California)	1,0
Sekvenseringsbuffer (5,0x)	1,5
Primer (10 $\mu$ M)	2,0
RNase fritt vann (Eppendorf, Hamburg, Tyskland)	2,5
Template	3,0
Totalt	10

**Tabell 9.** Amplifiseringsprosesser i forkant av sekvensering.

25 sykluser	Sekvenseringsreaksjon				
	Hold	Denature	Anneal	Extend	Hold
Temp.	96 °C	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
Tid	1 min	10 sek	5 sek	4 min	$\infty$
Volum	10 $\mu$ l				

Etter sekvenseringsreaksjonen ble det tilsatt 10  $\mu$ l MilliQ-vann i hver prøve, før oppbevaring ved -20 °C. Sekvenseringsreaksjonen ble senere sendt til sekvenseringscenteret ved Sars-senteret, Universitetet i Bergen, Norge, for automatisk DNA sekvensering.

#### Sekvensanalyse i Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) og Aligning i contigExpress:

De overlappende sekvensene av 16S rRNA- og *GyrB*-genene ble satt sammen til komplette sekvenser ved hjelp av ContigExpress (InforMax, Fredrick, MA, U.S.A.), i Vektor NTI Advance 10 data pakke. Sekvensene ble satt inn i BLAST-søk på hjemmesiden til NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), hvor likheter i sekvensene ble sammenlignet med andre bakterieisolater i databasen. Nukleoidsekvensene til de isolerte stammene ble også satt inn i AlignX i ContigExpress, for sammenligning med de opprinnelige smitteisolatenes gensekvens.

#### **2.5.4 Biokjemisk analyse**

Et standardisert identifiseringssystem for Enterobacteriaceae og andre Gram-negative staver er API 20 E (bioMérieux, Inc, Frankrike), opprinnelig utviklet for identifikasjon av humanpatogene bakterier (review av Popovic et al. 2007). Metoden virker hurtig, har høy sensitivitet og brukes til fenotypisk karakterisering av patogene fiskebakterier, inkludert *V. anguillarum* (Austin & Austin 2007). Et API 20 E kit består av 21 standardiserte og minimaliserte biokjemiske tester, og ble benyttet på de reisolerte stammene av *V. anguillarum* fra smitteforsøkene, samt de tre opprinnelige smitteisolatene; HI 21413, HI 21429 og HI 610. Bakteriene ble suspendert i 0,90 % fysiologisk saltvann. Mikrorørene

består av dehydrerte substanser som reagerer ved tilsetning av bakteriesuspensjon. Reaksjonene ble avlest og sammenlignet med resultatene fra Sandlund & Bergh (2008). Dette var en del av identifisering av de reisolerte isolatene. Bruksanvisning for API 20 E foreslår inkubering av strips på  $37 \pm 2$  °C i 18 - 24 timer. I dette forsøket ble derimot stripsene inkubert ved 15 °C i 48 timer. Disse endringene ble utført i samsvar med tidligere forsøk (review av Popovic et al. 2007, Sandlund & Bergh 2008).

## 2.6 MIC-forsøk

Bestemmelse av MIC-verdier ble utført ved hjelp av metoden for agarfortynning beskrevet av Washington (1985), Samuelsen & Lunestad (1996), og fire atypiske *V. anguillarum*-isolater ble benyttet i MIC-testen; HI 21412, HI 21413, HI 21424 og HI 21429. *A. salmonicida*, ATCC 33658, tidligere brukt i MIC-forsøk av Miller et al. (2005), ble brukt som kontrollisolat.

### 2.6.1 Antibakterielle løsninger

De antibakterielle midlene ble løst opp før tilsetning i Mueller-Hinton agar (MHA), se løsning i tabell 10. For mer effektiv oppløsning ble det brukt varmeskap i korte perioder (10 – 30 sek). Flumekvin og oksolinsyre er lyssensitive, da lys svekker virkemekanismen. Kolber med oppløst medikament ble derfor holdt tildekket under hele prosessen for å unngå fotooksidasjon.

**Tabell 10:** Løsemidler til de ulike antibakterielle midlene bruk i MIC-testen.

Antibakterielt middel	Løsemiddel (1mg ml <sup>-1</sup> )
Oksytetrasyklin	Milli-Q vann
Flumekvin	0,03 mM NaOH
Oksolinsyre	0,03 mM NaOH
Trimetoprim/sulfadiazine	Metanol, CH <sub>3</sub> OH
Florfenikol	Metanol, CH <sub>3</sub> OH

### 2.6.2 Agarskåler

Agarskåler ble klargjort 24 timer før bruk for å unngå nedbrytning av antibakterielt middel som følge av lagring. Prosessen er beskrevet i punkt 1 - 4.

1. Det ble laget 2 liter MHA tilsatt 2 % NaCl, per testmedikament. Det ble så fordelt 150 ml oppvarmet MHA i 11 autoklaverte ErlenMeyer kolber (500 ml). En ErlenMeyer kolbe (500 ml) ble tilsatt 300 ml oppvarmet MHA, denne ble brukt til hovedløsningen. For å oppnå full effekt av de antibakterielle midlene i MHA, måtte temperaturen ved tilsetning være under 50 °C (Andrews 2001).
2. ErlenMeyer kolben (500 ml) med 300 ml MHA ble tilsatt antibakterielt middel. Løsningen ble blandet, og 150 ml av denne løsning overført til neste kolbe som allerede inneholdt 150 ml MHA. Denne fortynningsmetoden ble gjentatt for alle fortynningene. Fortynningskonsentrasjonene for de antibakterielle midlene var

som følger; oxolinsyre ( $0,00314 \mu\text{l mg}^{-1}$  -  $16 \mu\text{l mg}^{-1}$ ), florfenikol ( $0,03 \mu\text{l mg}^{-1}$  -  $32 \mu\text{l mg}^{-1}$ ), flumequine og oxytetrasyklin ( $0,00314 \mu\text{l mg}^{-1}$  -  $4 \mu\text{l mg}^{-1}$ ) og trimetoprim/sulfadiazin ( $0,0155 \mu\text{l mg}^{-1}$  -  $16 \mu\text{l mg}^{-1}$ ).

3. For hver fortytning ble det fordelt 20 ml agarløsning på 45 mm Petriskåler; 6 replikate skåler per fortytning. Agarens pH ble målt ved hjelp av pH-meter.
4. Skålene ble oppbevart tildekket i romtemperatur over natt.

### **2.6.3 Fordeling av isolater på agarskåler**

For detaljer om inkubering av isolatene, se paragraf 2.2.2 Agarskålene med ulike konsentrasjoner av antibiotikua ble delt i 4 soner ved hjelp av tusjmerking. De fire testisolatene ble ved hjelp av en  $10 \mu\text{l}$  podenål fordelt på hver sin sone på agarskålen. Kontrollisolatet ble fordelt på tilsvarende måte, men på en egen skål. Skålene ble tildekket og inkubert ved  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$  for ATCC 33658). Etter 72 timer ble skålene avlest og MIC-verdier ble fastslått.



## 3 RESULTATER

### 3.1 Smittedoser

Hovedkulturene ble, på grunnlag av beregninger av totaltall fra en 10-folds fortytning, justert til de ønskede smittedosene. Hovedkulturene og smittedosene ble senere verifisert ved telling av kimtall (CFU). Resultatene for beregning av celler ml<sup>-1</sup> i hovedkulturene for pilotforsøket og hovedforsøket, er henholdsvis beskrevet i tabell 11 og 12.

**Tabell 11:** Celletall i bakteriekulturene til *V. anguillarum*-stamme HI 21413 og HI 21429, i pilotforsøket. Totaltall ble estimert fra 10-folds fortytningsserie, og anslår bakterier ml<sup>-1</sup> i hovedkulturen. CFU ble estimert fra tre tellinger av celletall på skål, der det var platet ut 100 µl bakteriesuspensjon fra en 10<sup>6</sup> fortytning. Sammen gir disse metodene grunnlag for å anslå et ca. celletall i hovedkulturen.

Testisolat	Totaltall	CFU	Hovedkultur (bakterier ml <sup>-1</sup> )
HI 21413	10 <sup>8</sup>	46	4,6 x 10 <sup>8</sup>
HI 21429	10 <sup>9</sup>	200,5	2,0 x 10 <sup>9</sup>

**Tabell 12:** Celletall i bakteriekulturene til *V. anguillarum*-stamme HI 21413, HI 21429 og HI 610, i hovedforsøket. Totaltall ble estimert fra 10-folds fortytningsserie, og anslår bakterier ml<sup>-1</sup> i hovedkulturen. CFU ble estimert fra tre tellinger av celletall på skål, der det var platet ut 100 µl bakteriesuspensjon fra en 10<sup>6</sup> fortytning. Sammen gir disse metodene grunnlag for å anslå et ca. celletall i hovedkulturen.

Testisolat	Totaltall	CFU	Hovedkultur (bakterier ml <sup>-1</sup> )
HI 21413	10 <sup>8</sup>	71,33	7,1 x 10 <sup>8</sup>
HI 21429	10 <sup>8</sup>	97,33	9,7 x 10 <sup>8</sup>
HI 610	9,6 x 10 <sup>7</sup>	-	9,6 x 10 <sup>7</sup>

I hovedforsøket var smittedosen med justert og estimert til å være 7,1 x 10<sup>6</sup> for gruppe 1, 9,7 x 10<sup>6</sup> for gruppe 2 og 9,6 x 10<sup>7</sup> for gruppe 3. I pilotforsøket var smittedosen justert og estimert til å være lavdose (10<sup>3</sup>), middeldose (10<sup>5</sup>) og høydose (10<sup>7</sup>). Se tabell 13 for estimeringer av antall bakterie i.p. injisert i hver fisk, i de tre ulike doseringsgruppene.

**Tabell 13:** Pilotforsøk: Antall bakterier injisert i hver fisk, med tre ulike smittedoser; lavdose (10<sup>3</sup>), middeldose (10<sup>5</sup>) og høydose (10<sup>7</sup>), beregnet fra estimert hovedkultur i tabell 11.

Testisolat	lavadose	middeldose	høydose
HI 21413	9,2 x 10 <sup>2</sup> bakterier	9,2 x 10 <sup>4</sup> bakterier	9,2 x 10 <sup>6</sup> bakterier
HI 21429	4,0 x 10 <sup>2</sup> bakterier	4,0 x 10 <sup>4</sup> bakterier	4,0 x 10 <sup>6</sup> bakterier

## 3.2 Pilotforsøk

Det ble registrert lav dødelighet i pilotforsøket, og de fleste karene hadde 100 % overlevelse. I kar 3, som inneholdt fisk injisert med HI 21413 (høydose:  $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ ), ble det registrert dødelighet hos totalt tre av fem fisk. Dødelighet i kar 3 ble registrert dag 4, 10 og 14 etter smitte. Fra to av de døde fiskene i kar 3 ble det reisolert *V. anguillarum* fra hodenyre og milt. I kar 5, hvor fisken var smittet med HI 21429 (lavdose:  $10^3$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ ) og den totale dødeligheten var en av fem fisk, døde fisken dag 17 etter smitte. Det ble ikke registrert dødelighet i kar 1, 2, 4, 6 og 7 ved forsøksavslutning.

### 3.2.1 Kliniske tegn

Den første uken etter smitte ble det registrert markante adferdsforskjeller mellom karene med smittet torskeyngel, sammenlignet med usmittet kontrollfisk i kar 4. I motsetning til kontrollfisken som hadde normal svømmeadferd, samlet den infiserte forsøksfisken seg i klynger på bunnen av karene, nær veggen og nær avløpet. Fisken virket passiv med lite svømmeaktivitet, og ved tilnærming av karene hadde fisken en nervøs adferd. Fisken som døde i pilotforsøket viste tydelige tegn for klassisk vibriose. Spesielt fremtredene var eksoftalmi, mørk hudfarge og finneråte. Fisken hadde svekket appetitt, i tillegg til at den virket inaktiv. Disseksjon viste at fisken hadde ascites i bukhulen, og utspilt tarm. Disse kliniske tegnene ble ikke observert hos fisk som overlevde forsøket.

### 3.2.2 Likheter i nukleotidsekvenser

Det ble funnet to *Vibrio anguillarum* stammer i denne identifiseringsprosessen (se tabell 24 i avsnitt 7.5 i appendiks). Begge de reisolerte stammene var fra fisk som døde i kar 3, i.p. injisert med HI 21413. Ved sammenligning av nukleotidsekvensene til de reisolerte stammene fra den døde fisken med nukleotidsekvensene til smitteagens HI 21413, i programvaren ContigExpress AlignX (InforMax, Fredrick, MA, U.S.A.), resulterte dette i tilnærmet 100 % likhet.

Ved hjelp av søk i BLAST, ble 16S rRNA- og *GyraseB*-genet til de ulike isolatene, sammenlignet med gensekvenser til *Vibrio (Listonella) anguillarum*-stammer som allerede er registrert i et databasebibliotek på denne søkesiden. De reisolerte isolatene hadde mellom 98 % - 100 % likhet med andre *V. anguillarum*-stammer.

### 3.2.3 API 20 E

De to reisolerte *V. anguillarum*-stammene fra pilotforsøket, samt de opprinnelige smitteisolatene (HI 21413 og HI 21429), ble API 20 E testet. De reisolerte *V. anguillarum*-stammene gav identisk API 20 E profil som smitteisolatene HI 21413 og HI 21429, og alle fire isolatene gav lik fenotypisk karakterisering som er kjent hos andre *V. anguillarum*-stammer. Dette ble fastslått ved hjelp av ALO test (A: arginine decarboxylase, L: lysine decarboxylase, O: ornithine decarboxylase), som gir en identifikasjon for *V. anguillarum*-stammer ved å vise: A+ /L- /O- (Alsina & Blanch 1994).

### 3.3 Hovedforsøk

På grunn av det totale antallet individer benyttet i hvert kar (25 - 32) og hver gruppe (84 - 92), så utgjorde hvert individ  $> 1 \%$  av det totale antallet individer (tabell 14). Dette resulterte i at beregninger av kumulativ dødelighet gav svar med 2 eller flere desimaler. Kumulativ dødelighet i hvert kar, vil derfor besvares med to desimaler, før sammenslåing av dødelighetsdata i karene, til tross for at dette egentlig ikke er vanlig ved så lavt individtall. Ved sammenslåing av dødelighet i de replikate karene, for å lage en felles gruppe for hver behandling, ble svaret for endelig kumulativ dødelighet rundet av til nærmeste hele tall, uten desimaler.

**Tabell 14:** Oversikt over hvor mange prosent hvert individ, i hver av de fire smittegruppene utgjør av totaltallet i gruppen.

Gruppe:	Utrekning:	Prosentverdi per individ i gruppen
1	$(1/84)*100$	1,19 %
2	$(1/88)*100$	1,14 %
3	$(1/92)*100$	1,09 %
4	$(1/90)*100$	1,11 %

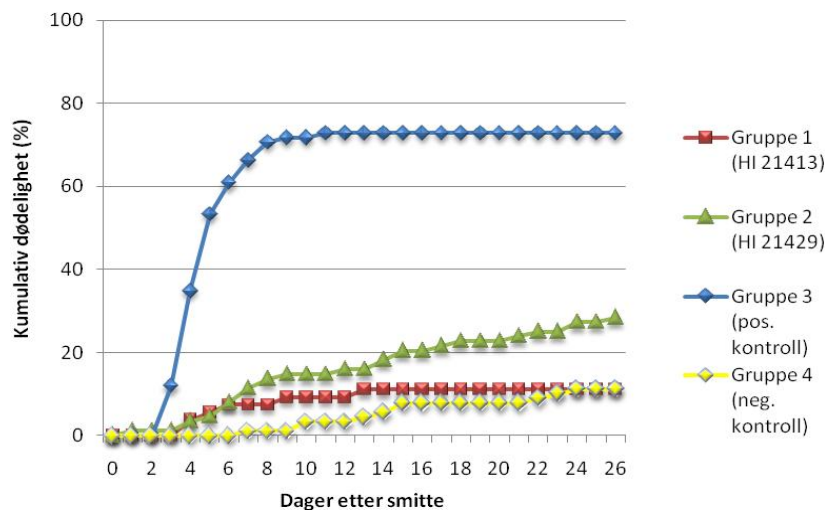
Forsøket ble avsluttet dag 26 etter smitte for alle kar. I gruppe 1 og gruppe 2 startet dødeligheten dag 4 etter smitte. Kumulativ dødelighet i de tre replikate karene ved forsøksavslutning i gruppe 1 (HI 21413) endte på henholdsvis 23,33 %, 10,34 % og 12,00 %. Siste dødelighet ble registrert dag 13 etter smitte. I gruppe 2 (HI 21429) var kumulativ dødelighet i de tre replikate karene på henholdsvis 30,00 %, 27,59 %, 27,59 %. Siste dødelighet ble registrert dag 26 etter smitte. I gruppe 3 (positiv kontroll) ble første dødelighet registrert dag 3 etter smitte. Den kumulative dødeligheten i de tre replikate karene, endte på henholdsvis 63,33 %, 76,67 % og 73,13 %. Siste dødelighet ble registrert dag 11 etter smitte. I gruppe 4 (negativ kontroll) ble første dødelighet registrert dag 7 etter forsøksstart. Ved forsøksavslutning endte den kumulative dødeligheten i de tre replikate karene på henholdsvis 13,33 %, 6,67 % og 13,33 %.

Dødelighetsdata for de replikate karene i hver gruppe ble ved hjelp av statistiske vurderinger (G-test) slått sammen for å bli behandlet som en gruppe (tabell 15). I gruppe 1 viste G-testen en signifikant ( $p < 0,05$ ) ulikhet i antall døde individ mellom de replikate karene. Dette medførte at kar 1, med signifikant høyere dødelighet enn kar 2 og kar 3, måtte forkastes før sammenslåing. Det ble ikke registrert signifikante forskjeller innen de andre gruppene.

**Tabell 15.** Oversikt over total dødelighet ved forsøksavslutning i de ulike behandlingsgruppene av torsk smittet med ulike isolater av *V. anguillarum*, fordelt på tre paralleller i hver gruppe. Statistisk utregning (G-test for uavhengighet ( $p < 0,05$ )) indikerer om parallellene i hver gruppe er sammenlignbare og dermed ikke signifikant ulike, eller om enkelte forsøksdata må forkastes.

Gruppe:	Kar 1		Kar 2		Kar 3		G-test
	Ant. døde individ/ totalt	Kumulativ dødelighet %	Ant. døde individ/ totalt	Kumulativ dødelighet %	Ant. Døde individ/ totalt	Kumulativ dødelighet %	Statistisk utregning
1	7/30	23,33	3/29	10,34	3/25	12,00	$p < 0.05$
1	-	-	3/29	10,34	3/25	12,00	Ingen signifikans
2	9/30	30,00	8/29	27,59	8/29	27,59	Ingen signifikans
3	19/30	63,33	23/30	76,67	25/32	78,13	Ingen signifikans
4	4/30	13,33	2/30	6,67	4/30	13,33	Ingen signifikans

Kumulativ dødelighet for gruppe 1 og gruppe 2 endte derfor på henholdsvis 11 % og 28 %. I gruppe 3 og gruppe 4 var den endelige kumulative dødeligheten på henholdsvis 73 % og 11 %. For detaljer om kumulativ dødelighet for de fire gruppene, se figur 4.



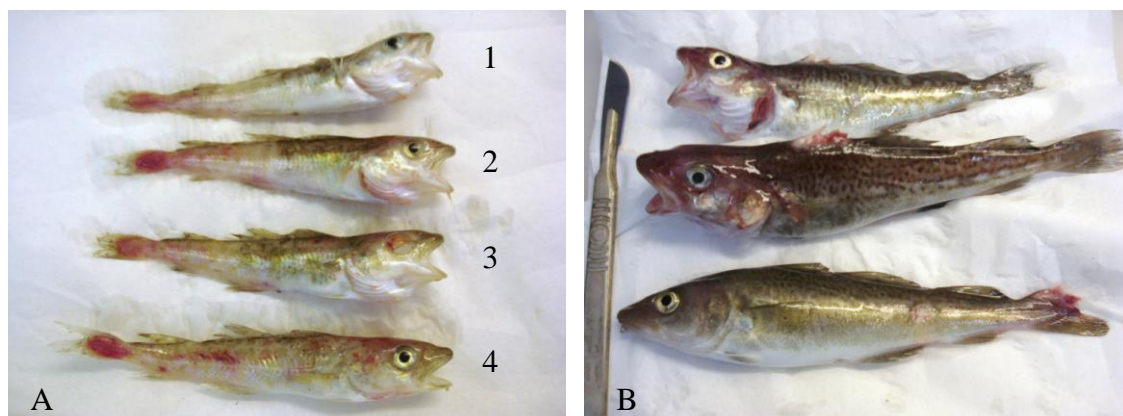
**Figur 4.** *Gadus morhua*. Kumulativ dødelighet for de fire forsøksgruppene av torsk smittet med bakterien *V. anguillarum*. To av gruppene ble badsmittet med testisolat HI 21413 (gruppe 1) og HI 21429 (gruppe 2), og en gruppe ble badsmittet med kontrollisolat HI 610 (gruppe 3). Den fjerde gruppen var usmittet kontroll (gruppe 4). De replikate karene som var statistisk sammenlignbare ble slått sammen. Temperatur; 12 ( $\pm 0,5$ ) °C.

I gruppe 1 og gruppe 2 var det hovedsakelig den minste fisken som døde i smitteforsøket. Fisken var mellom 10 - 20 g. I gruppe 3 ble det registrert dødelighet hos fisk mellom 10 - 70 g. Dødelighet i gruppe 4 rammet også hovedsakelig den minste fisken som var i intervallet 11 - 33 g.

Dødelighetsdata fra de ulike gruppene ble sammenlignet ved hjelp av 2x2 kontingenstabell. Gruppe 1 og gruppe 2 hadde signifikante forskjeller i dødelighet fra dag 24 til forsøksavslutning på dag 26. Både gruppe 1 og gruppe 2 hadde signifikant lavere dødelighet enn gruppe 3 fra dag tre etter forsøksstart og gjennom hele forsøket. Ved å sammenligne dødelighet i gruppe 1 og gruppe 4, var det en signifikant forskjell i dødelighet på dag 6 etter smitte, men før og etter dette var det ingen signifikante forskjeller. Gruppe 2 hadde signifikant høyere dødelighet enn gruppe 4 fra dag 6 etter smitte, frem til forsøksavslutning. For nærmere informasjon om signifikante forskjeller i dødelighet mellom de fire forsøksgruppene, se tabell 22 i avsnitt 7.4 i appendiks.

### 3.3.1 Kliniske tegn

Den døde fisken i gruppe 1 og gruppe 2 fra hovedforsøket var unormalt lys i fargen og viste tegn til hemoragisk septikemi og finneråte. Blødninger i hud, spesielt ved finnebasis, i munnregionen, samt i muskulatur var fremtredende (figur 5). I noen av fisken ble det observert utspilt tarm. De samme kliniske tegnene ble observert hos død fisk fra gruppe 4 (negativ kontroll). Død fisk fra gruppe 3 (positiv kontroll) hadde typiske sykdomstegn for klassisk vibriose; gelèaktig heving på ryggfinne og halefinne, samt blødninger i hoderegion. Hos noen av fiskene ble det observert ulcerasjoner i hud samt fremtredende finneråte (figur 5). De hematopoetiske organene var i mange tilfeller bleket. Det ble i begge forsøkene registrert at flere fisk manglet øyne og bukhule. De fleste av de døde fiskene hadde utspilte gjellelokk og var gapende. Bendelorm (*Diphyllobothrium latum*) og kveis (*Anisakis simplex*) ble funnet i enkelte av den døde og overlevende fisken.



**Figur 5.** *Gadus morhua*. Bilde A: HI 21429- og HI 21413-infisert torsk. Fisk 1, 2 og 4 er infisert med HI 21429, Fisk 3 er infisert med HI 21413. Kraftig finneråte, hemoragisk septikemi, lys hudfargen ble observert. Bilde B: HI 610-infisert torsk med kraftig finneråte, mørk farge, fremtrede og dype ulcerasjoner.

### 3.3.2 Kolonimorfologi

Isolatene dyrket opp fra hodenyre, milt, muskel og hud, fra både død og overlevende fisk, viste variasjoner og ulikheter i farge, hemolyse og konsistens. Kolonier fra kontrollisolat HI 610 gav tydelige hemolytiske soner på blodagar. HI 21413 og HI 21429 var i følge Sandlund & Bergh (2008) svakt hemolytiske på blodagar (Difco) (BA). I dette forsøket gav de reisolerte stammene av HI 21413, grønn hemolyse på blodagar. Reisolerte stammer av HI 21429 var svakt- eller ikke hemolytiske. De reisolerte *V. anguillarum*-stammene ble også plattet ut på Marine Agar (MA), og alle isolatene gav lik vekst og en lys og kremet oransj-farge. Ved dyrking av testisolatene (HI 21413 og HI 21429) på Tryptone Citrate Bile Salt agar (TCBS) kom det frem gul/grønne, fete kolonier og agaren ble gul-farget. Dette indikerer at bakteriene er syreproduserende. Dette var også tilfellet hos *V. anguillarum*-isolatene som ble reisolert fra hodenyre, milt og muskel. Dette står i samsvar med kolonimorfologien til testisolatene, beskrevet av Sandlund & Bergh (2008).

### 3.3.3 Likheter i nukleotidsekvenser

Det ble reisolert åtte *V. anguillarum*-stammer fra død fisk i hovedforsøket (se tabell 23-26 i appendiks), ett isolat ble identifisert fra *gyrB*-genet og de resterende syv isolatene ble identifisert fra 16S rRNA-genet. Det ble reisolert fem *V. anguillarum*-isolat fra de døde fiskene badsmittet med stamme HI 21429, to stammer fra de døde fiskene smittet med HI 21413 og ett isolat fra fisk badsmittet med HI 610 (positiv kontroll). Ved sammenligning av nukleotidsekvensene til de reisolerte stammene fra den døde fisken med nukleotidsekvensene til de opprinnelige smitteagenes (HI 21413, HI 21429 og HI 610) i

programvaren ContigExpress AlignX, resulterte dette i oppimot 100 % likhet. Isolatene ble også identifisert i BLAST.

#### **3.3.4 API 20 E**

De åtte reisolerte *V. anguillarum*-stammene fra den døde fisken i badsmitteforsøket, ble sammen med smitteisolatene (brukt som kontroll i dette forsøket) API 20 E testet. Kun to av de reisolerte isolatene viste identisk API 20 E profil som smitteagens (kontrollisolat). De samme isolatene ble identifisert som *V. anguillarum* ved hjelp av ALO test (for mer detaljer, se avsnitt 3.2.3) Kontrollisolat HI 21413 og HI 21429, skilte seg fra HI 610 og det ved å reagere positiv på amygdalin (AMY) og NO<sub>2</sub>. De resterende seks stammene viste avvikende resultater i forhold til ALO testen, og i forhold til API 20 E profilen til kontrollstammene. Se tabell 18, avsnitt 7.2 i appendiks for mer detaljerte resultater fra API 20 E testen.

#### **3.3.5 Mono Va**

Tilnærmet 50 % av isolatene som ble isolert fra den døde fisken ble testet med Mono-Va kit for *V. anguillarum*. Ingen av isolatene gav positivt utslag på testen, dette står i samsvar med smitteagens HI 21413 og HI 21429.



### 3.4 MIC-forsøk

Det ble registrert forskjellige MIC-verdier for de fem antibakterielle midlene testet på de ulike stammene av *V. anguillarum*. Den laveste MIC-verdien ble registrert for oksolinsyre og flumekvin, fulgt av oksytetrasyklin. Høyest MIC-verdi ble registrert for florfenikol og trimetoprim/sulfadiazine. Resultater av MIC-verdier i dette forsøket er listet i tabell 16.

*V. anguillarum*-isolat HI 21412 viste størst sensitivitet og hadde en to-folds lavere MIC-verdi for alle de antibakterielle midlene i sammenligning med de andre tre resterende forsøksstammene, som hadde like MIC-verdier for alle de antibakterielle midlene.

Resultater registrert hos kontrollisolat *Aeromonas salmonicida*, stod i samsvar med MIC-verdier for isolatet i tidligere forsøk utført av Miller et al. (2005).

**Tabell 16.** En oversikt over MIC-verdiene ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) *V. anguillarum*-isolatene; HI 21312, HI 21413, HI 21414 og HI 21429, samt kontrollisolatet ATCC 33658, har for oksolinsyre, oksytetrasyklin, flumekvin, florfenikol og trimetoprim/sulfadiazine. Alle isolater ble testet på Mueller Hinton agar med 2 % NaCl.

Antibakterielle midler	Testspekter ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	MIC-verdi ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )				
		HI 21412	HI 21413	HI 21414	HI 21429	ATCC 33658
Oksolinsyre	0,03-16	0,125	0,25	0,25	0,25	0,0312
Oksytetrasyklin	0,03-4	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
Flumekvin	0,007-4	0,125	0,25	0,25	0,25	0,062
Florfenikol	0,03-32	1	2	2	2	1
Trimetoprim/sulfadiazine	0,015-16	1	2	2	2	1

## 4 DISKUSJON

### 4.1 Smitteforsøk

Bakterielle infeksjoner forårsaket av *V. anguillarum* er et stort problem i norsk torskoppdrett og medfører store økonomiske tap. Bakterien infiserer fisken i alle livsstadier og dagens vaksiner ser ikke alltid ut til å gi tilstrekkelig beskyttelse. Kartlegging av ukjente *V. anguillarum*-isolater, serotyping, samt vaksineutvikling og optimalisering av bekjempelsesmetoder, er noen av de tiltakene som må vektlegges for å oppnå kontroll over denne sykdomsproblematikken.

Testisolatene HI 21413 og HI 21429, er tidligere vist å være atypiske, da de skiller seg fra andre *V. anguillarum*-stammer ved at de ikke lot seg serotype, og de reagerte negativt på Mono-Va agglutinasjonskit tilpasset *V. anguillarum* (Sandlund & Bergh 2008). De samme isolatene ble i dette forsøket virulensstestet på torskkeyngel ved hjelp av i.p. injeksjonssmitte og badsmitte, og ga relativt lav dødelighet sammenlignet med tidligere resultater fra et badsmitteforsøk med de samme isolatene på plommesecklarver (Sandlund & Bergh 2008).

I pilotforsøket hvor yngelen ble i.p. injisert, var dødeligheten varierende, men generelt lav. Det ble påvist dødelighet i to av syv kar. I kar 3, smittet med den høyeste dosen ( $10^7$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ ) av stamme HI 21413, døde totalt tre av fem fisk. Individene i dette karet døde på dag 4, 10 og 14 etter smitte. *V. anguillarum* ble reisolert fra to av de døde fiskene i denne gruppen, og testisolatet kan derfor verifiseres som dødsårsaken. Til tross for et lavt individtall i karet var det en relativ høy dødelighet i denne smittegruppen. I Kar 5, smittet med den laveste dosen ( $10^3$  bakterier  $\text{ml}^{-1}$ ) av isolat HI 21429, døde totalt en av fem fisk. Fisken døde på dag 17 etter smitte. Ettersom bakterien ikke ble reisolert er dødsårsaken uviss.

Badsmitteforsøkets to smittegrupper gav en klarere indikasjon på graden av virulens testisolatene HI 21413 og HI 21429 har på yngel, sammenlignet med pilotforsøket. Et høyere individtall ga også grunnlag for statistiske evalueringer, og ved hjelp av statistiske analyser ble det testet for signifikante forskjeller i dødelighet mellom de tre replikate

karene, internt i hver av smittegruppene (gruppe 1 og gruppe 2) og i kontrollgruppene (gruppe 3 og gruppe 4). Det ble funnet signifikante forskjeller i dødelighet i en av de fire gruppene. Dette var i gruppe 1, hvor den kumulative dødeligheten i de replikate karene var på henholdsvis 23,33 %, 10,34 % og 12,00 %. Basert på resultatet fra G-testen ble det derfor avgjort at kar 1 (med dødelighet 23,33 %) ikke skulle inkluderes i den endelige sammenslåingen av dødelighetsprosent for denne gruppen. Gruppe 1 fikk dermed lavere kumulativ dødelighet enn den ellers ville hatt hvis alle tre karene var med i sammenslåingen av en felles gruppe. Kumulativ dødelighet i gruppe 1 lå derfor på tilsvarende nivå som den negative kontrollgruppen med usmittet fisk i gruppe 4. Den signifikante dødelighetsforskjellen i gruppe 1, sammenlignet med gruppe 2 og gruppe 3, kan være relatert til karforholdene. Individfordelingen i karene var ujevn, og antall forsøksindivid i kar 1, 2 og 3 var på henholdsvis 30, 29 og 25 individ. Om forskjellen i individtetthet mellom karene kan ha gitt ulikt stress, kan ikke utelukkes.

Ved sammenslåing av dødelighet i de replikate karene, endte den kumulative dødeligheten i gruppe 1 (HI 21413) og gruppe 2 (HI 21429), på henholdsvis 11 % og 28 %. I gruppe 3 (positiv kontroll badsmittet med HI 610) og gruppe 4 (usmittet negativ kontroll), var den endelige kumulative dødeligheten på henholdsvis 73 % og 11 %. Dødeligheten i hovedforsøket viser, på samme måte som ved i.p. injeksjon, at torskeyngelen var lite mottakelig for de to atypiske *V. anguillarum*-testisolatene, også ved badsmitte. Testisolatene (HI 21413 og HI 21429) var lavvirulente sammenlignet med det positive kontrollisolatet (HI 610), og gruppe 1 og gruppe 2 hadde signifikant lavere dødelighet enn gruppe 3, gjennom hele forsøket. Gruppe 3 hadde, sammenlignet med tidligere utførte lignende forsøk, tilnærmet normalt dødelighetsforløp for torsk infisert med HI 610 i eksperimentelle oppsett, og da dødeligheten stagnerte var det tydelig økning i vekst på den overlevende fisken. Den spiste bra og var aktiv. Ved å sammenligne dødeligheten i gruppe 3 med resultater fra tidligere smitteforsøk med det samme isolatet (HI 610), hvor dødeligheten var på 87,5 % (Samuelsen & Bergh 2004), 82 % (Vik-Mo et al. 2005) og 77 % (Seljestokken et al. 2006), bekrefter resultatene fra den positive kontrollgruppen dermed validiteten av forsøket.

Tidspunkt for første og siste registrerte dødelighet i de fire ulike gruppene i hovedforsøket var forskjellige. Gruppe 1 og gruppe 2 startet begge med dødelighet på dag 4 etter smitte. Siste dødelighet ble registrert henholdsvis på dag 13 og dag 26 etter smitte. I gruppe 3 startet dødeligheten dag 3 etter smitte, og siste dødelighet ble registrert dag 11 etter

smitte. I tidligere smitteforsøk med torsk, hvor *V. anguillarum*-stamme HI 610 har vært smitteagens, var første dødelighet registrert dag 3 etter smitte og endelig kumulativ dødelighet dag 22 etter smitte (Samuelsen & Bergh 2004). I et annet lignende forsøk utført av Seljestokken et al. (2006) var første dødelighet registrert dag 4 etter smitte, og endelig kumulativ dødelighet ble registrert dag 15 etter smitte. Dette viste at dødelighetsforløpet i gruppe 3 var noe kortere enn hva som tidligere er vist, dette kan skyldes individuelle forskjeller, og kan være påvirket av ulike miljøparametre. Dette er i samsvar med resultater i forsøk av Kettunen & Fjalestad (2006), hvor det ble studert familievariasjoner hos torsk (20 familier), og deres motstandsdyktighet mot klassisk vibriose i eksperimentelle oppsett. Her ble det vist at det var signifikante forskjeller mellom ulike familier, og ulik dødelighet ble observert. Et effektivt avlsarbeid kan derfor bidra til å redusere sykdomsproblemene.

I gruppe 4 ble første dødelighet registrert dag 9 etter forsøksstart. Endelig kumulativ dødelighet ble registrert dag 26 etter smitte, og var på dette tidspunktet identisk med kumulativ dødelighet for gruppe 1. Dødelighetsforløpet i gruppe 1 startet imidlertid tidligere enn i gruppe 4. På dag 13 etter smitte, når den siste døde fisk ble registrert i gruppe 1, var det en stor forskjell i kumulativ dødelighet mellom gruppene på henholdsvis 11 % og 4 %. Til tross for dette, ble det kun registrert signifikante forskjeller i dødelighet mellom gruppe 1 og gruppe 4, på dag 6 i forsøket. Gruppe 2 hadde signifikant høyere dødelighet enn gruppe 4 fra dag 6 og gjennom hele forsøket. Gruppe 3 (positiv kontroll) hadde signifikant høyere dødelighet enn gruppe 1 og gruppe 2 gjennom hele forsøket. Dette viser virulensforskjellene hos testisolatene sammenlignet med kontrollisolatet HI 610.

En personlig observasjon gjort av Hari Rudra ved Havforskningsinstituttet, var at ubehandlet fisk fra samme kull som fisken brukt i dette eksperimentelle oppsettet, begynte å dø på samme tidspunkt som det ble registrert dødelighet i gruppen med usmittet kontrollfisk. Da denne fisken ikke var en del av dette forsøksoppsettet vil det ikke være mulig trekke dødelighetsdata fra disse fiskene inn i dette forsøket, men observasjonen gir likevel en indikasjon på at den ubehandlede kontrolltorsk i gruppe 4 var mottakelig for patogener fra sine omgivelser.

I forsøksoppsettet var det ønskelig å ha 90 individ i hvert kar, men fordelingen av fisk var i intervallet 84 - 92 individ per gruppe (se tabell 3 i avsnitt 2.4.1). Tettheten i karene ble

helt klart påvirket av dette, men om det var nok til å påvirke utbrudd i de forskjellige gruppene er vanskelig å si. Ved beregninger av signifikante forskjeller i kumulativ dødelighet, kan dette gi utslag, da individene i de ulike gruppene gir forskjellige prosentverdier, der noen individ er mer vektet enn andre ut fra variasjoner i det totale antallet individer per gruppe. Dette er likevel en minimal påvirkningsfaktor.

I begge smittforsøkene ble det reisolert *V. anguillarum*-isolater fra død fisk smittet med de to testisolatene, samt med kontrollisolat HI 610. I pilotforsøket ble det reisolert *V. anguillarum* fra to av de døde fiskene i.p injisert med HI 21413 i kar 3. Fra fisk badsmittet i hovedforsøket ble det til sammen reisolert åtte *V. anguillarum*-isolater. Fem av isolatene var fra fisk infisert med HI 21429, to av isolatene var fra fisk smittet med HI 21413 og ett av isolatene var fra fisk smittet med HI 610. For å få en sikker identifisering til art ved sekvenseringsanalyse av 16S rRNA- og *gyrB*-gen, er et vanlig akseptert kriterium en minimums likhet på 97 % (Hagström et al 2002). De reisolerte stammene ble først identifisert i BLAST-søk med 98-100 % likhet med andre *V. anguillarum*-stammer. Gensekvensene til de reisolerte isolatene ble deretter sammenlignet ("alignet") med gensekvensene til de opprinnelige testisolatene og funnet å være opp mot 100 % like. Dette viser med meget stor sannsynlighet at det er det agenset det ble smittet med som faktisk ble reisolert. Med andre ord, fisken døde som følge av smitte med testisolatene.

Det ble også gjort en sammenligning av API 20 E resultater fra de ti reisolerte isolatene fra pilot- og hovedforsøket, mot testisolatene fiskene var smittet med. Isolatet som ble reisolert fra fisk i gruppe 3, badsmittet med kontrollisolat HI 610, gav identisk API 20 E profil som kontrollstammen. Isolatene reisolert fra pilotforsøket gav identisk API 20 E profil som HI 21413 og HI 21429. *V. anguillarum*-isolatene HI 21413 og HI 21429 skilte seg fra *V. anguillarum*-stamme HI 610 ved å reagere positivt til amygdalin og NO<sub>2</sub>. Det samme var tilfellet for de tre reisolerte isolatene som hadde identisk API 20 E profil som HI 610, HI 21413 og HI 21429. Dette kan indikere at det er flere egenskaper som gjør testisolatene atypiske. De resterende reisolerte isolatene gav noe ulike profiler (se tabell 18 i appendiks), dette til tross at isolatene var genotypisk like. Disse resultatene tyder på at denne metoden alene ikke er optimal for identifisering av bakterieisolater, da det er faktorer som for eksempel temperatur og tidsbruk under oppsett og analyse, som kan påvirke resultatet i denne testen. Metoden er imidlertid velegnet for sammenlikning av to eller flere bakterieisolater, under forutsetningene at testen settes opp og kjøres samtidig.

*V. anguillarum*-stammer er beskrevet som hemolytiske når de dyrkes på blodagar (BA) (Buller & Plumb 2004). De to testisolatene som ble virulenstestet i dette forsøket, er tidligere beskrevet som svakt hemolytiske på BA (Sandlund & Bergh 2008). Bakterieprøver reisolert fra fisk smittet med HI 21413 og HI 610, viste grønn hemolyse på skål, mens de reisolerte prøvene fra fisk smittet med HI 21329, gav svak eller ingen hemolyse uten klare hemolytiske soner.

Ved dyrking av testisolatene på Thiosulphate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS), kom det frem gul-grønne, fete kolonier og den grønne agaren ble gul farget. De samme gjaldt for alle de reisolerte *V. anguillarum*-stammene. I følge Buller & Plumb (2004) er det vanlig med variert vekst for *V. anguillarum*-isolater på TCBS. Dette kan verifiseres med at koloniene dyrket på TCBS etter hvert endret farge og ble grønnfarget.

*V. anguillarum*-stammene HI 21413 og HI 21429 har i tidligere studier av Sandlund og Bergh (2008), vist å reagere negativt på Mono-Va identifiseringstesten. Testen ble likevel brukt på ca 50 % av de isolerte isolatene fra gruppe 1 (HI 21413), gruppe 2 (HI 21429) og gruppe 4 (usmittet kontrollfisk) i hovedforsøket. Dette var for å utelukke krysskontaminering med det positive kontrollisolatet HI 610, da dette isolatet reagerer positivt på Mono-Va agglutinasjonstest. Ingen av isolatene som ble testet på Mono-Va identifiseringstest gav positivt utslag. Testen gav derfor grunnlag til å avkrefte krysskontaminering og en eventuell infeksjon fra andre type *V. anguillarum*, enn forsøksisolatene som ble virulenstestet.

Fisken var før forsøksstart syk og ble behandlet med et antibiotikum. Analyser av bakterielle prøver tatt fra død fisk før forsøksstart, viste at *V. anguillarum* ikke forårsaket denne dødeligheten. Dette kan derfor indikere at en eventuell naturlig motstandsoppbygning, som følge av infeksjon med klassisk vibriose, ikke er sannsynlig, og heller ikke påvirket resultatene i smitteforsøkene.

Gjennom hele badsmitteforsøket ble fisken som døde veid og kliniske tegn registrert. I Austin & Austin (2007) beskrives vibriose som en hemoragisk septikemi med misfarginger i hud, røde nekrotiske lesjoner i muskel, blodige hevelser ved finnebasis og finneråte. Infisert fisk blir beskrevet som inaktiv, med redusert appetitt, og høy dødelighet kan registreres. Mage, tarm og endetarm kan bli oppblåst og utvidet. I pilotforsøket viste fisken

mange av de samme kliniske tegnene. Fisken ble tydelig mørkere i huden, nesten svart, og eksoftalmi var fremtredende hos alle fiskene som døde. Tarmen til to av fiskene som døde i forsøket var oppblåst ved disseksjon. I hovedforsøket hadde fisken andre kliniske tegn. Her var fisken preget av påfallende lys hud, hemoragisk septikemi og kraftig finneråte. Blødninger i hud, spesielt ved finnebasis og munnregionen, samt i muskulatur var fremtredende. Eksoftalmi ble ikke observert. Fisken i gruppe 3 (positiv kontroll, smittet med HI 610) viste typiske tegn på vibriose, og hadde mørke misfarginger i hud, hudsår, røde nekrotiske lesjoner i muskel, blodige hevelser ved finnebasis og finneråte. Bakterielle prøver isolert fra muskulatur hos to av fiskene fra hovedforsøket som var infisert med HI 21413, viste seg å være reisolerte *V. anguillarum*-stammer. Det ble ikke gjort funn av patologi i den overlevende fisken, og ingen atypiske *V. anguillarum* ble reisolert. Det kan være en indikasjon på at torskeyngel har en evne til å kvitte seg med disse bakteriene.

Observasjoner på død fisk i gruppe 1 og gruppe 2, samt usmittet kontrollfisk i gruppe 4, var nær identiske i forhold til størrelse, vekt og ytre kliniske tegn. I likhet med gruppe 1 og gruppe 2, var det også i gruppe 4 den minste og svakeste fisken som døde. Ettersom fisken ikke ble veid ved forsøksstart, var det ikke mulig å utføre statistiske sammenlikninger mellom gruppene. Data på vektmålinger av de døde fiskene gir likevel tydelige indikasjoner på at det var den svakeste og minste fisken som døde ved badsmitte med testisolat HI 21413 og HI 21429. Den døde fisken i gruppe 1, gruppe 2 og gruppe 4 ville i en oppdrettsituasjon blitt klassifisert som "tapere" ut i fra størrelse og utseende. Forskjeller i tidspunkt for dødelighet i gruppe 1 og gruppe 2, som hadde første dødelighet dag 4 etter smitte, og gruppe 4, som hadde første dødelighet dag 9 etter forsøksstart, kan tyde på at testisolatene har fremprovosert og induisert dødelighet på et tidligere tidspunkt enn ved naturlige forhold, og at fisken ville ha dødd etter hvert uansett. Flere fisk manglet øyne og buk ved veiing, dette kan ha påvirket den reelle vekten. I gruppe 3 ble fisk i alle størrelser rammet av dødelighet.

Ved forsøksstart for pilotforsøket og hovedforsøket var det henholdsvis 40 og 70 dager siden fisken hadde vært gjennom en behandling med medisinfôr (oksolinsyre). I tidligere studier er det vist at temperatur, salinitet, administrering av legemiddel og størrelse på individet, kan påvirke farmakokinetiske parametre som absorpsjon, biotilgjengelighet og utskillelse av antibakterielle midler (Hustvedt et al. 1991, Samuelsen et al. 1999, Samuelsen et al. 2003). Torsk har høyere biotilgjengelighet enn laks og kveite, og i tillegg har torsken lengre utskillestid av administrerte legemidler (review av Samuelsen 2006,

review av Samuelsen et al. 2006). Basert på farmakokinetiske parametre for torsk som er presentert i forsøk av Samuelsen et al. (2001), så tilsvarte fiskens restverdier av antibakterielt middel ved forsøksstart, et langt lavere nivå enn bakterienes MIC-verdier for oksolinsyre ( $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), og kunne derfor ikke ha svekket bakteriene. Det var derfor grunnlag for å konkludere med at fisken ikke lengre var påvirket av denne behandlingen ved forsøksstart for noen av smitteforsøkene.

Ikke-optimale forhold fører ofte til stress hos fisken, noe som gjør fisken mer mottakelig for sykdom. Stress som følge av høy tetthet, høy temperatur, lavt oksygeninnhold og ugunstig pH i vannet, er faktorer som kan påvirke mottakelighet for smitte. For å oppnå valide resultater i en eksperimentell situasjon, bør miljøet forsøksfisken befinner seg i gjøres så likt de naturlige oppdrettsforhold som mulig.

Økt temperatur vil i følge studier av Larsen et al. (2004), påvirke tidspunktet for vibriose utbrudd. Dødelighet er ofte assosiert med sjøvannstemperaturer over  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  (Bergh 2002, Austin & Austin 2007), og utbrudd er hyppigst registrert i sommermånedene (Review av Toranzo & Barja 1990, Lillehaug et al. 2003). I pilotforsøket ble temperaturen hevet fra  $9 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  til  $13 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  på dag 8 etter i.p. injeksjonssmitte. Den første fisken som døde i pilotforsøket var fra kar 3, og døde på dag 4 etter smitte, ved  $9 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ytterligere dødelighet i pilotforsøket ble registrert etter at temperaturen ble hevet, noe som kan være et resultat av at fisken ble stresset ved temperaturhevingen. Den lave dødeligheten ved  $9 \text{ }^\circ\text{C}$  kan skyldes at bakteriene befant seg i omgivelser med sub-optimale temperaturer, eller at fiskens immunforsvar ikke var svekket. Begge disse parametrene indikerer at forutsetningene for utbrudd av vibriose i mindre grad var til stede. De samme bakteriene gav derimot massiv dødelighet hos plommesekkclarver badsmittet ved  $7 \text{ }^\circ\text{C}$  (Sandlund & Bergh (2008). Dette viser at bakteriene er virulente også ved lave temperaturer og det kan tenkes at den høye dødeligheten hos plommesekkclarver skyldes at torskene her var på et vesentlig mer primitivt ontogenetisk stadium, og dermed mer mottakelig for infeksjon.

I hovedforsøket ble temperaturen i karene hevet fra  $9 \text{ }^\circ\text{C}$  til  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  på smittedagen. Sammenlignet med pilotforsøket som hadde liten eller ingen dødelighet den første uken, ble det i dette forsøket registrert dødelighet i begge gruppene dag 4 etter smitte. Dette er normal utbruddshastighet for *V. anguillarum* sammenlignet med lignende forsøk (Samuelsen et al. 2004, Vik-Mo et al. 2005, Seljestokken et al. 2006). Det kan derfor



spekuleres i om hevning av temperatur spiller en avgjørende rolle for infeksjon med lavvirulente stammer, siden det i pilotforsøket ikke var foretatt temperaturhevning på dette tidspunktet, og det først ved temperaturhevingen en uke etter forsøksstart, ble registrert ytterligere dødelighet.

Uttrykk av virulensfaktorer hos patogene bakterier kan bli "regulert" av miljøbetingede forhold. Blant slike forhold er: temperatur, pH, oksygen og tilgjengelighet av jern (review av Griffiths 1991, review av Hansen & Olafsen, 1999). I forsøk av Hoare et al. (2002) ble det målt virulens (ved injeksjonssmitte) av *V. anguillarum* på tre stammer (kanadisk, islandsk og norsk) atlantisk kveite (*Hippoglossus hippoglossus* L.) ved to ulike temperaturer; 12 °C og 18 °C. Total kumulativ dødelighet for den kanadiske og islandske stammen ved 18 °C var henholdsvis 53,4 % og 61,85 %, sammenlignet med 32 % og 26,6 % ved 12 °C. Den norske stammen hadde en signifikant lavere dødelighet sammenlignet med de to overnevnte stammene med en kumulativ dødelighet på 13,3 % ved 18 °C, og 25 % ved 12 °C. Ut i fra resultatene for de kanadiske og islandske stammene indikerer dette at små variasjoner i temperatur gir utslag på bakteriens virulens, men avvikende resultater for det norske isolatet tilsier at det finnes variasjoner i trend mellom ulike stammer. Det kan derfor spekuleres i om isolatene i hovedforsøket ville gitt høyere kumulativ dødelighet dersom temperaturen i karene hadde vært hevet til 15-16 °C, som er en optimal temperatur for *V. anguillarum* (Austin & Austin 2007). Dette er også en vanntemperatur som på sommerhalvåret vanligvis assosieres med vibrioseutbrudd (Review av Toranzo & Barja 1990, Lillehaug et al. 2003). Også andre fenotypiske uttrykk kan være temperaturavhengige. I et forsøk av Larsen et al. (2004) for blant annet å studere temperaturens påvirkning av *V. anguillarum* bakteriens kjemotaksi, ble tre temperaturer testet; 5 °C, 15 °C og 25 °C. Den høyeste kjemotaktiske responsen ble registrert ved 25 °C. Dette er en indikator på at *V. anguillarum* er best tilpasset høyere temperaturer.

I forsøket til Hoare et al. (2002) ble det benyttet injeksjonssmitte, og fisken ble i dette forsøket sultet i 48 t. For å unngå stikk i tarm, er sulting og tømning av tarm før injeksjon viktig. I dette forsøket ble fisken sultet i 24 t før smitte. Dette kan ha vært for kort tid i forhold til at fisken fikk tømt mage og tarmsystemet. Om det har en påvirkning på dødelighet er usikkert. Feil stikksted ved i.p injeksjon kan ha ført til at bakteriesuspensjonen har sivet ut igjen, og dermed hatt en redusert effekt.

Stress knyttet til høy individtetthet i en oppdrettsituasjon vil kunne svekke fiskens evne til å motstå sykdom. Høy tetthet i torskoppdrett kan føre til stress, noe som bidrar til at uvaksinert torsk lettere rammes av vibriose (Bergh et al. 2005). Dette ble ikke tatt hensyn til i pilotforsøket da etiske hensyn, i form av minimalisering av antall forsøksindivider, ble vektlagt, og det ble tilfeldig fordelt fem individ i hvert kar. Det lave individtallet gjør at tetthet neppe var en stressfaktor i dette forsøket. Lav fisketetthet og lave temperaturer har vist seg å være gode vekstvilkår for torsk, men sub-optimale forhold for fiskepatogene bakterier som *V. anguillarum*, da blant annet bakteriens svømmehastighet reduseres ved lave temperaturer. (Larsen et al. 2004). Fisken ble likevel stresset i bedøvelsesprosessen før i.p. injeksjon, noe som kan ha gjort fisken mer mottakelig for patogenet. Forsøksresultatene viser imidlertid lav dødelighet, så virkningen av dette er derfor vanskelig å fastslå. Vaskeprosedyren av bakteriesuspensjonen før injeksjonssmitte, kan også ha svekket bakteriene og ført til redusert virulens (Planas et al. 2005), bl.a. gjennom tap av flageller. I et forsøk av Larsen et al. (2004) ble det vist at den maksimale motiliteten til *V. anguillarum* bakterier var høyere i vekstmedium, enn hos vaskede bakterier som var resuspendert i PBS.

I hovedforsøket var individtettheten høyere, da det var ønskelig å sette opp et forsøksoppsett som var mest mulig etterlignet en oppdrettsituasjon. Dette kan ha medført mer stress. Sammen med den høye temperaturen kan det spekuleres i om dette er faktorer som kan ha påvirket dødeligheten i større grad enn i pilotforsøket, hvor forholdene var bedre tilrettelagt for fisken og dermed mer sub-optimale for bakterien.

## 4.2 MIC-test

Dette studiet gir en oversikt over MIC-verdiene *V. anguillarum*-isolatene; HI 21312, HI 21413, HI 21414 og HI 21429, har for oksolinsyre, flumekvin, florfenikol, oksytetrazyklin, trimetoprim/sulfadiazine.

Metodene for MIC-testing er mange. I dette forsøket ble bakteriesuspensjonen platet ut på agarskåler som hadde ulike konsentrasjoner av antibiotika. Denne metoden gir kun et direkte estimat av MIC-verdier hvis det er et lineært forhold mellom konsentrasjon av antibakterielt middel og diameter av et område hvor bakteriesuspensjon påføres. Det er derfor avgjørende med en standardisert metode for tilførsel av inokulatet for å unngå variasjoner i resultatene. For økt presisjon ble det brukt en 10 µl podenål for påføring av bakteriesuspensjon på en bestemt avgrenset sone.

For å verifisere eller falsifisere MIC-verdiene fra de ulike testisolatene, ble en *Aeromonas salmonicida*-stamme (ATCC 33658), tidligere testet i et forsøk av Miller et al. (2005), benyttet som kontrollstamme. Dette isolatet ble kultivert ved 22 °C, i motsetning til *V. anguillarum*-isolatene som ble kultivert på 15 °C. Alle isolatene ble testet på samme type agarskål med de samme konsentrasjonene av antibakterielle midler. MIC-verdiene for ATCC 33658, var tilsvarende resultatene i Miller et al. (2005). For testisolatene ble resultatene som forventet i forhold til lignende studier (Martinsen et al. 1992, Vik-Mo 2004); de laveste MIC-verdiene ble registrert for oksolinsyre og flumekvin, etterfulgt av oksytetrazyklin. Høyest MIC-verdi ble registrert for florfenikol og trimetoprim/sulfadiazine.

Testisolatet HI 21412 var det mest følsomme av de fire atypiske isolatene som ble MIC-testet. Isolatet hadde, sammenlignet med de andre isolatene som ble testet, halverte MIC-verdier for alle de antibakterielle midlene som ble testet i forsøket. API 20 E-test viste ifølge Sandlund & Bergh (2008) at HI 21413, HI 21414 og HI 21429 testet negativt på utnyttelse av arabinose, mens HI 21412 testet positivt. HI 21412 gav også raskere utslag på dødelighet hos plommeseekklarver enn de andre isolatene (Sandlund & Bergh 2008). Dette er i samsvar med resultatene fra MIC-testen som viser at HI 21412 også her skilte seg fra de andre isolatene.

Ved å sammenligne resultatene i denne MIC-testen, med resultater i tidligere forsøk av Martinsen et al. (1992) hvor 11 stammer av *V. anguillarum* ble MIC-testet, og Vik-Mo (2004) hvor 20 stammer av *V. anguillarum* ble testet, registreres det noen ulikheter i resultatene (tabell 17).

**Tabell 17:** Sammenligning av MIC-verdier ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) hos ulike *V. anguillarum*-isolater for fem antibakterielle midler, fra dette forsøket, samt fra Martinsen et al. (1992) og Vik-Mo (2004).

Antibakterielle midler	Rangert MIC-verdier ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for:		
	MIC- verdier på isolatene i dette forsøket (4 stammer)	Martinsen et al. (1992) (11 stammer)	Vik-Mo (2004) (20 stammer)
Okolinsyre	0,125 - 0,25	0,005 - 0,09	0,03 - 0,25
Oksytetrasyklin	0,25 - 0,5	0,73 - 48	0,25 - 128
Flumekvin	0,125 - 0,25	0,01 - 0,18	0,06 - 0,5
Florfenikol	1 - 2		0,5 - 4
Trimetoprim/sulfadiazine	1 - 2		0,5 - 2

Ved å sammenligne MIC-verdiene for trimetoprim/sulfadiazine, med resultater fra Vik-Mo (2004), er MIC-verdiene veldig samsvarte. Samuelson (1997) testet *V. anguillarum*-stamme HI 610 med det samme antibakterielle medikamentet og fikk en MIC-verdi på 0,8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Vik-Mo (2004) fikk en MIC-verdi på 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for det samme isolatet. Disse resultatene verifiserer MIC-verdiene som ble bestemt for trimetoprim/sulfadiazine i dette forsøket. Ved sammenligning av MIC-verdier for oksytetrasyklin og flumekvin i dette forsøket med MIC-verdiene for de samme antibakterielle midlene som ble funnet av Martinsen et al. (1992) og Vik-Mo (2004), er resultatene litt høyere. MIC-verdiene for florfenikol er i dette forsøket innen rangeringen av MIC-verdier i Vik-Mo (2004).

MIC-verdier for oksolinsyre i dette forsøket er noe høyere enn MIC-verdier vist i Martinsen et al. (1992). Det samme gjelder for MIC-verdiene for Flumekvin. Martinsen et al. (1992) har også lavere MIC-verdi for disse antibakterielle midlene hvis en sammenligner med resultatene i Vik-Mo (2004). Dette gir grunnlag for spekulasjon om det skjer en utvikling mot økt følsomhet for stammer av *V. anguillarum* over tid. Veterinærinstituttet har foretatt studier på resistensutvikling mot antibakterielle midler som oksolinsyre (det mest brukte midlet i torskeoppdrett) hos *V. anguillarum*-isolater, som har vist at *V. anguillarum*-serotype O2  $\beta$  har nedsatt følsomhet i flere tilfeller (Hellberg et al. 2008, 2009). Det brukes lite oksytetrasyklin i torskeoppdrett sammenlignet med de andre nevnte antibakterielle midlene.

Faktorer som kan ha innvirkning på MIC-resultatene er næringsbetingelser i mediet som kan påvirke lagfasen og veksthastigheten til bakterien. Det er også viktig å måle pH på agaren for å få jevn pH i de forskjellige testene ved ulike antibiotika, da dette kan ha en innvirkning på resultatet. Anbefalt pH på mediet er 7,2 - 7,4, det ble i dette forsøket registrert en pH på 7,4. Dette indikerer at pH ikke har vært en påvirkende faktor i MIC-resultatene.

I MIC-test av *V. anguillarum* er tilsetning av salt nødvendig da bakterien er avhengig av salt i vekstmediet. Det er derfor vanlig å tilsette 2 % NaCl- eller 25 ‰ sjøvannstilsetning. Det ble i dette studiet valgt å tilsette 2 % NaCl i Mueller Hinton Agar (MHA). Dette er en metode tidligere benyttet av Samuelsen & Bergh (2004). Et tidligere forsøk (Vik-Mo et al. 2005) viste signifikante forskjeller i MIC-verdier basert på agarskåler med 25 ‰ sjøvannstilsetning og agarskåler med 2 % NaCl-tilsetning. Dette gjaldt for antibakterielle midler som flumekvin, oksolinsyre, oksytetrasyklin og trimetoprim/sulfadiazine. For florfenikol var forskjellene i MIC-verdier ved de ulike medietilsetningene ikke signifikant. Dette kan skyldes at dette middelet ikke binder seg til kationer i sjøvann. Kationer som  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  kan påvirke den antibakterielle effekten av ulike antibakterielle midler brukt i norsk akvakultur (Lunestad & Goksøyr 1990, Torkildsen et al. 2000). Dette er data som bør tas med i betraktning når fisken skal behandles, og ikke er i stand til å ta opp de antibakterielle middelene like effektivt i bunden form.

Oksytetrasyklin ble, til tross av inhibering i sjøvann, MIC-testet på testisolatene. Dette fordi at legemiddelet kan administreres ved hjelp av i.p. injeksjon, noe som ikke svekker fiskens evne til å absorbere medikamentet i like stor grad, som ved oral administrering over tarmvegg.

## 5 KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

Klassisk vibriose har lenge vært et velkjent problem for oppdrettstorsk (Egidius 1987), og er i tillegg kjent hos villtorsk (Bagge & Bagge 1956). Et effektivt torskeoppdrett, hvor kvantitet og kvalitet er i fokus, er derfor avhengig av en effektiv sykdomskontroll, og en god oversikt over nåværende og senere potensielle bakterielle problemer i torskeoppdrett.

Resultatene i virulenstestene av de to atypiske *V. anguillarum*-isolatene HI 21413 og HI 21429, viste lav dødelighet. Stammene kan derfor klassifiseres som lavvirulente patogener, men med en viss negativ effekt på overlevelse hos torskeyngel. Sammenlignet med kontrollisolatet HI 610, var testisolatene lavvirulente med en signifikant lavere dødelighet gjennom hele badsmittforsøket. Det kan se ut som om de to lavvirulente stammene enten kan forårsake sykdom direkte etter smitte med høye doser av bakterier, eller at de kan elimineres av fiskens immunsystem. Det siste kan hevdes på bakgrunn av at det ikke ble reisolert *V. anguillarum* fra overlevende individer. Testisolatene kan også klassifiseres som lavvirulente for torskeyngel sett i forhold til tidligere smittforsøk utført på plommeseckklarver, hvor de ble funnet å være høyvirulente (Sandlund & Bergh 2008).

Yngel er i motsetning til plommeseckklarver immunkompetent, dette innebærer et mer velutviklet immunforsvar som mest sannsynlig har beskyttet yngelen mot et kraftigere utbrudd. Resultatene gav også indikasjoner på at kun den minste fisken i testgruppene døde, noe som gir grunnlag for spekulasjoner rundt fiskens størrelse i forhold til utbrudd. Det er derfor ønskelig å sette opp et nytt virulensforsøk med de samme isolatene, men med noen modifiseringer. Det vil være ønskelig å virulensteste isolatene på mindre yngel, for eksempel ca. 1 - 5 g. Dette vil forhåpentligvis gi en indikasjon på om størrelsen på fisken og derved graden av immunkompetanse spiller noen rolle for grad av infeksjon og dødelighet disse isolatene forårsaker. Det vil også være ønskelig å undersøke om høyere grad av stress ved smitte, for eksempel individtetthet og temperatur kan påvirke utvikling av sykdom.

Dersom fisk av visse størrelser blir angrepet av bestemte typer av *V. anguillarum*-bakterien, så er dette en viktig faktor å ta hensyn til i vaksineutvikling. Ved vaksineutvikling er det spesielt viktig å ha kunnskap til de ulike bakterienes serologiske

egenskaper. Sandlund & Bergh (2008) forsøkte å serotype testisolatene ved hjelp av farging med tre forskjellige absorberende polyklonale antiserum mot stammen HI 610 med serotype O2 $\alpha$ , samt serotypene O2 $\beta$  og O1. Positiv immunofarging ble kun funnet når testisolatene ble farget med antiserum mot HI 610, serotype O2  $\alpha$ . Dette viser at isolatene har serologiske likheter med denne stammen, men om den reagerer på andre antiserum mot O2 $\alpha$  vet vi ennå ikke. En endelig serotyping av isolatene gjenstår, og bør ha høy prioritet, da dette er en viktig del av karakterisering av bakteriene, og vil ha betydning for eventuelle vaksiner. Tilgang på spesifikke antisera vil også gjøre det mulig å undersøke patologi og patogenese ved infeksjoner med disse bakteriene.

De fire isolatene gav høy dødelighet hos plommeseckklarver og en forholdsvis lav dødelighet hos yngel på ca. 10 - 20 g. Det er likevel usikkert hvordan isolatene vil påvirke mindre yngel. Hvis mindre yngel er mer mottakelig vil det være viktig med behandlingsregimer som fungerer. MIC-verdier for stammene ble bestemt, og testen viste at *V. anguillarum*-stamme HI 21412 var det mest sensitive isolatet, og MIC-verdiene var en to-folds konsentrasjon lavere enn MIC-verdiene hos de andre stammene som ble testet i forsøket.

MIC-testen var en viktig del av oppgaven, siden det er ønskelig å samle data for flest mulig *V. anguillarum*-stammer, og dette er informasjon som bidrar til oversikt over bakterienes følsomhet for de antibakterielle midlene som brukes i norsk akvakultur. Som videre arbeid vil det også være ønskelig å MIC-teste isolatene på medium med sjøvannstilsetning, for å se hvordan bakterienes MIC-verdier påvirkes av dette.

## 6 REFERANSELISTE

- Alsina M, Blanch AR (1994) A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J Appl Bacteriol 76:79-45
- Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother 48:5-16
- Anonym (2008) Statistikk; Torsk  
Tilgjengelig på URL (dato: 11.05.09)  
<http://www.fiskeridirektoratet.no/fiskeridir/akvakultur/statistikk/statistikk-for-akvakultur/torsk>
- Anonym (2009a) Forbruk av antibiotika i norsk fiskeoppdrett i 2008.  
Tilgjengelig på URL (dato: 20.05.09)  
[http://www.mattilsynet.no/fisk/helsemessig\\_trygg/forbruk\\_av\\_antibiotika\\_i\\_norsk\\_fiskeoppdrett\\_i\\_2008\\_60772](http://www.mattilsynet.no/fisk/helsemessig_trygg/forbruk_av_antibiotika_i_norsk_fiskeoppdrett_i_2008_60772)
- Anonym (2009b) Forbruk av legemidler i norsk fiskeoppdrett i 2001-2008.  
Tilgjengelig på URL (dato: 20.05.09)  
[http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=Area\\_5774&MainArea\\_5661=5565:0:15,2675:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_5565=5774:0:15,2675:1:0:0:::0:0&Area\\_5774=5544:73845::1:5776:1:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=Area_5774&MainArea_5661=5565:0:15,2675:1:0:0:::0:0&MainLeft_5565=5774:0:15,2675:1:0:0:::0:0&Area_5774=5544:73845::1:5776:1:::0:0)
- Anonym (2009c) Rømmingstatistikk  
Tilgjengelig på URL (dato: 27.05.09)  
<http://www.fiskeridir.no/fiskeridir/akvakultur/statistikk/roemningsstatistikk>
- Anonym (2009d) Statistikk; Laks, regnbueørret og ørret.  
Tilgjengelig på URL (dato: 11.05.09)  
<http://www.fiskeridirektoratet.no/fiskeridir/akvakultur/statistikk/statistikk-for-akvakultur/laks-regnbueoerret-og-oerret>
- Austin B, Austin D (2007) Characteristics of pathogens: Gram-negativ bacteria. I: Austin B, Austin D (red) Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish. Springer and Praxis publishing, Chichester, UK. s. 81-150
- Bagge J, Bagge O (1956) *Vibrio anguillarum* som årsag til ulcussygdom hos torsk (*Gadus callaris*, Linnè). Vet med 8:481-492
- Bay L, Larsen JL, Leisner JJ (2007) Distribution of three genes involved in the PJM1 iron-sequestering system in various *Vibrio anguillarum* serogroups. Syst Appl Microbiology 30:85-92
- Bergey DH, Holt JG (2009) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9 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 (2002) Også oppdrettstorsken kommer til å bli syk. I: Glette J, Meeren Tvd, Olsen RE, Skrilbrei O (red) Havbruksrapporten 2002, Fisken og Havet, særnr.2-2002. s. 90-92
- Bergh Ø, Samuelsen OB, Korsnes K (2005) Sykdommer hos torsk, forbygging og behandling. I: Otterå H, Taranger GL, Borthen J (red) Oppdrett av torsk – en næring med fremtid. Norsk fiskeoppdrett AS, Bergen, Norge s. 177-182
- Bleie H (2002) Helsesituasjonen 2001-marine arter i oppdrett. I: Glette J, Meeren Tvd, Olsen RE, Skilbrei O(red) Havbruksrapporten 2002, Fisken og havet. Havforskningnsinstituttet, Bergen. s. 46-48
- Borthen J Otterå H, Taranger GL, (2005) Innledning. I: Otterå H, Taranger GL, Borthen J (red) Oppdrett av torsk – næring med framtid. Norsk fiskeoppdrett AS, Bergen, Norge s. 9-14
- Bricknell IR, Bron JE, Bowden TJ (2006) Diseases of gadoid fish in cultivation: a review. ICES J Mar Sci 63:253-266
- Buller NB, Plumb JA (2004) Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing, Cambridge, USA. (elektronisk utgave)  
Tilgjengelig på URL (dato: 22.05.09)  
[http://books.google.com/books?hl=no&lr=&id=CRxISUP2Ga4C&oi=fnd&pg=PP9&dq=Buller,+Bacteria+from+fish+&ots=A4tS7jhFSK&sig=AaF2Yciefl\\_zejNIHieu5f-jYpQ](http://books.google.com/books?hl=no&lr=&id=CRxISUP2Ga4C&oi=fnd&pg=PP9&dq=Buller,+Bacteria+from+fish+&ots=A4tS7jhFSK&sig=AaF2Yciefl_zejNIHieu5f-jYpQ)
- Cowell RR, Grimes DJ (1984) Vibrio diseases of marine fish populations. Helgol Meeresunters 37:265-287
- Egidius E (1987) Vibriosis - Pathogenicity and Pathology - A review. Aquaculture 67:15-28
- Elston R, Drum AS, Bunell PR (1995) Furunculosis injection model for drug efficacy testing of seawater-adapted Atlantic salmon. J Aquat Anim Health 7:16-21
- Espeliid S, Rødseth OM, Jørgensen TØ (1991) Vaccination experiments and studies of the humeral immune responses in cod, *Gadus morhua* L., to four strains of monoclonal-defined *Vibrio anguillarum*. J Fish Dis 14:185-197
- Fowler J, Cohen L (1997) Analysing frequencies. Fowler J, Cohen L (red) Practical statistics for field biology. John Wiley & sons. s. 111-129
- Grave K, Engelstad M, Søli NE, Håstein T (1990) Utilization of antibacterial drugs in salmonidfarming in Norway during 1980-1988. Aquaculture 86:347-358
- Griffiths E (1991) Reviews, Environmental regulation of bacterial virulence – implications for vaccine design and production. TIBTECH 9:309-315
- Hagström Å, Pommier T, Rohwer F, Simu K, Stolte W, Svensson D, Zweifel UL (2002) Use of 16S Ribosomal DNA for Delineation of Marine Bacterioplankton Species. Appl Environ Microbiol 68:3628-3633

- Haugen T, Taranger GL (2009) Produksjon av rene hunnfiskpopulasjoner av atlantisk torsk. I: Agnalt AL, Bakketeig IE, Haug T, Knutsen JA, Opstad I (red) Kyst og havbruk 2009, særnummer 2-2009. s. 151-153
- Hansen GH, Olafsen JA (1999) Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb Ecol* 38:1-26
- Hellberg H, Colquhoun D, Hansen H, Nilsen H (2007) Helsesituasjonen hos marin fisk 2007. (elektronisk utgave)  
Tilgjengelig på URL (dato: 22.05.09)  
<http://www.vetinst.no/nor/Forskning/Publikasjoner/Fiskehelse rapporten/Helsesituasjonen-hos-oppdrettsfisk-2007>
- Hellberg H, Mikalsen J, Colquhoun D, Hansen H, Nilsen A (2008) Helsesituasjonen hos marinfisk 2008. (elektronisk utgave)  
Tilgjengelig på URL (dato: 22.05.09)  
<http://www.vetinst.no/nor/Forskning/Publikasjoner/Fiskehelse rapporten/Helsesituasjonen-hos-oppdrettsfisk-2008>
- Hoare R, Hovland H, Langston AL, Imsland A, Stefansson SO, Mulcahy M, Wergeland HI (2002) Susceptibility of three different strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cultured at two different temperatures to *Vibrio anguillarum* and temperature effect on antibody response. *Fish and Shellfish Immunol* 13:111-123
- Hustvedt SO, Salte R, Kvendset O, Vassvik V (1991) Bioavailability of oxolinic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from medicated feed. *Aquaculture* 97:305-310
- Inamura H, Nakai T, Muroga K (1985) An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 51:1915-1920
- Johannsdottir JT, Hakonardottir K, Hrolfsdottir L, Hermannsdottir R, Steinarsson A, Bjørnsdottir R (2008) Detection and stimulation of IgM production in first feeding Cod (*Gadus morhua*) larvae. Poster. International conference on Fish diseases and fish immunology. Reykjavik, Island.
- Kado C, Helinski DR (2007) Proceedings of the International Symposium on Plasmid Biology. *Plasmid* 57:215-215
- Kettunen A, Fjalestad KT (2006) Resistance to vibriosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): First challenge test results. *Aquaculture* 258:263-269
- Knappskog DH, Rødseth OM, Slinde E, Endresen C (1993) Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis. *J Fish Dis* 16:327-338
- Kurlansky M. (1999) Det farlige farvannet som heter naturens motstandskraft. I: Kurlansky M (red) Torsk – En biografi om fisken som forandret verden. JM Stenersens forlag AS, Oslo, Norge. s.190-205

- Lamas J, Santos Y, Bruno DW, Toranzo AE, Oanadom R (1994) Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J Fish Biol* 45:839-854
- Larsen MH, Blackburn N, Larsen JL, Olsen JE (2004) Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. *Microbiol* 150:1283-1290.
- Larsen JL, Pedersen K, Dalsgaard I (1994) *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *J Fish Dis* 17:259-267
- Larsen JL, Pedersen K (1999) Infeksjoner med Vibrio-bakterier. I: Poppe T (red) Fiskehelse og fiske sykdommer. Universitetsforlaget. s. 68-83
- Lassen T (2009) Produksjon av torsk og kveite i 2008. I: Agnalt AL, Bakketeig IE, Haug T, Knutsen JA, Opstad I (red) Kyst og havbruk 2009, særnummer 2-2009 S.131-132
- Lillehaug A, Lunestad BT, Grave K (2003) Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture—a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Dis Aquat Org* 53:115-125
- Lund V, Børdal S, Kjellsen O, Mikkelsen H, Schrøder MB (2006) Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Dev Comp Immunol* 30:1145-1155
- Lund V, Børdal S, Schrøder MB (2007) Specificity and durability of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) immunised with *Vibrio anguillarum* O2b. *Fish and Shellfish Immunol* 23:906-910
- Lunestad BT, Goksøyr J (1990) Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Dis Aquat Org* 9:67-72
- MacDonell MT, Cowell RR (1985) Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* 6:171-182.
- Magnadóttir B, Lange S, Gudmundsdóttir S, Bøggwald J, Dalmo RA (2005) Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunol* 19:429-439
- Martinsen B, Oppegaard H, Wichstrøm R, Myhr E (1992) Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1738-1743
- Mikkelsen H, Schrøder MB, Lund V (2004) Vibriosis and atypical furunculosis vaccines; efficacy, specificity and side effects in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture*. 242:81-91
- Mikkelsen H, Lund V, Martinsen LC, Gravningen K, Schrøder MB (2007) Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L): Characterisation and vaccination studies. *Aquaculture* 266:16-25

- Mikkelsen H, Lund V, Børdal S, Schrøder MB (2008) Challenge model for mediated transmission of disease between fish species. *Aquaculture* 287:388-394
- Milton DL, O'Toole R, Hörstedt P, Wolf-Watz H (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* 178:1310-1319
- Miller RA, Walker RD, J. Carson J, Coles M, Coyne R, Dalsgaard I, Gieseke C, Hsu HM, Mathers JJ, Papapetropoulou M, Petty B, Teitzel C, Reimschuessel R (2005) Standardization of a broth micro dilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Dis Aquat Org* 64:211-222
- Moksness E, Kjørsvik E, Olsen Y (2004) Introduksjon I: Moksness E, Kjørsvik E, Olsen Y (red) Culture of Cold-Water Marine Fish. Blackwell Publishing Ltd Oxford. s. 1-6.
- Pazos F, Santos Y, Magariños B, Bandín I, Núñez S, Toranzo AE (1993) Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Appl Environ Microbiol* 59:2969-2976
- Pedersen T, Falk-Petersen IB (1992) Morphological changes during metamorphosis in Cod *Gadus morhua* L, with particular reference to the development of the stomach and Pyloric ceca. *J Fish Biol* 41:449-461
- Pedersen H (2009) "Sats på torsk"; Fiskeri- og kystminister Helga Pedersens innlegg under nettverksmøtet "Sats på torsk" - 12. februar 2009.  
Tilgjengelig på URL (dato: 03.04.09)  
[http://www.regjeringen.no/nb/dep/fkd/dep/fiskeri-og\\_kystminister\\_helga\\_pedersen/taler\\_artikler/2009/videre-satsing-pa-torskeoppdrett.html?id=545897](http://www.regjeringen.no/nb/dep/fkd/dep/fiskeri-og_kystminister_helga_pedersen/taler_artikler/2009/videre-satsing-pa-torskeoppdrett.html?id=545897)
- Pedersen K, Grisez L, van Houdt R, Tiainen T, Ollevier F, Larsen JL (1999) Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of Seven provisional O-serogroups. *Curr Microbiol* 38:183-189
- Planas M, Perez-Lorenzo M, Vazquez JA, Pintado J (2005) A model for experimental infections with *Vibrio (Listonella) anguillarum* in first feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae under hatchery conditions. *Aquaculture* 250:232-243
- Popovic NT, Coz-Rankovac R, Strunjak Perovic I (2007) Commercial phenotypic test (API 20 E) in diagnosis of fish bacteria: a review. *Vet Med* 52:49-53
- Razquin BE, Castillo A, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena AJ (1990) Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immune- and enzyme-histochemical study. *J Fish Biol* 36:159-173
- Reid HI, Treasurer JW, Adam B, Birkbeck TH (2009) Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture* 288:36-43
- Rodaut B, Yorke J-C (2002) High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. *J Chromatography B*, 780:481-485

- Rødseth O M, Tangerås A (2002) Forebyggende helsearbeid. I: Glette J, Meeren T v d, Olsen R E, Skilbrei O (red) Havbruksrapporten 2002 , Fisken og havet, Havforskningsinstituttet, Bergen. s.97-100
- Samuelsen OB, Lunestad BT (1996) Bath treatment, an alternative method for the administration of the quinolones flumequine and oxolinic acid to halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and in vitro antibacterial activity of the drugs against some *Vibrio* sp. Dis Aquat Org 27:13-18
- Samuelsen OB (1997) Efficacy of bath-administered flumequine and oxolinic acid in the treatment of vibriosis in small Atlantic halibut. J aquat Anim Health 9:127-131
- Samuelsen OB, Ervik A (1999) A single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., held in sea water at 9 °C. J Fish Dis 22:13-23
- Samuelsen OB, Ervik A, Pursell L, Smith P (2000) Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater and *in vitro* antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 187:213–224
- Samuelsen OB, Bergh Ø, Ervik A (2003) A single-dose pharmacokinetic study of florfenicol in cod (*Gadus morhua* L.) held in seawater at 8°C and *in vitro* antibacterial activity against some *Vibrio anguillarum* strains isolated from diseased cod. Dis Aquat Org 56:127–133
- Samuelsen OB, Bergh Ø (2004) Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 235:27-35.
- Samuelsen OB (2006) Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. Aquaculture 255:55-75
- Samuelsen OB, Nerland AH, Jørgensen T, Schrøder MB, Svåsand T, Bergh Ø (2006) Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. Dis Aquat Org 71:239-254
- Sandlund N, Bergh Ø (2008) Screening and characterisation of potentially pathogenic bacteria associated with Atlantic cod *Gadus morhua* larvae: Bath challenge trials using a multidish system. Dis Aquat Org 81:203-217
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 74:5463-5467.
- Schrøder MB, Villenat AJ, Jørgensen TØ (1998) Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Dev Comp Immunol 22:507-517
- Schrøder MB, Espelid S, Jørgensen TØ (1992) Two serotypes of *Vibrio salmonicida* isolated from diseased cod (*Gadus morhua* L.); virulence, immunological studies and vaccination experiments. Fish Shellfish Immunol 2:211-221

- Schrøder MB, Mikkelsen H, Børdal S, Gravningen K, Lund V (2006) Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture* 254:46-53.
- Seljestokken B, Bergh Ø, Melingen GO, Rudra H, Olsen RH, Samuelsen OB (2006) Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod, *Gadus morhua* L., with florfenicol. *J Fish Dis* 29:737-742
- Smith P (2006) Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: A review of current practice. *Aquaculture* 261:1113-1121
- Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P (2005) Vaccines for fish in aquaculture. *Rev. Expert Rev Vac* 4:89 -101
- Stroke M, Lorenzo MD, Welch TJ, Crosa LM, Crosa JH (2002) Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* 48:222-228
- Svåsand T, Otterå HM, Taranger GL (2004) Atlantic Cod. I: Mosksness E, Kjørsvik E, Olsen Y (red) *Culture of Cold-Water Marine Fish; The status and perspectives of the species.* Blackwell publishing, Oxford, s 432-474.
- Svåsand T, Jørstad KE, Karlsbakk E, Taranger GL (2009) Kystorsk og torskeoppdrett – et umulig naboskap? I: Agnalt AL, Bakketeig IE, Haug T, Knutsen JA, Opstad I (red) *Kyst og havbruk 2009, Havforskningsinstituttet, Bergen.* s. 46-49
- Sørensen UBS, Larsen JL (1986) Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbio.* 51:593-597
- Thompson FL, Iida T, Swings J (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiology Mol Biol Rev* 68:403-431
- Torkildsen L, Samuelsen OB, Lunestad BT, Bergh Ø (2000) Minimum inhibitory concentration of chloramfenicol, florfenicol, trimethoprim-sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvar. *Aquaculture* 185:1-12
- Toranzo AE, Barja JL, Potter SA, Colwell RR, Hetrick FM, Crosa JH (1983) Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infect. Immun.* 39:1220-1227
- Toranzo AE, Barja JL (1990) A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aquat Org* 9:73-81
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37- 61
- Vadstein O, Mo TA, Bergh Ø (2004) Microbial interactions, prophylaxis and diseases. I: Mosksness E, Kjørsvik E, Olsen Y (red) *Culture of cold-marine fish.* Blackwell Publishing Ltd. Oxford. S. 487-516

- Vik-Mo FT (2004) Treatment of Vibriosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Efficacy of orally administered flumequine, and the impact of seawater on the susceptibility of *Listonella (Vibrio) anguillatum* to antibacterial agents. Mastergrad i Fiskehelse, Universitetet i Bergen, Hordaland.
- Vik-Mo FT, Bergh Ø, Samuelsen OB (2005) Efficacy of orally administered flumequine in the treatment of vibriosis caused by *Listonella anguillarum* in Atlantic cod *Gadus morhua*. Dis Aquat Org 67:87-92
- Yamamoto S, Harayama S (1995) PCR Amplification and direct sequencing of *GyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas-putida* strains. Appl Environ Microbiol 61:1104–1109
- Washington JA II (1985) Susceptibility tests: agar dilution. I: Lennette EH, Balows A, Hausler Jr. WJ, Shadomy HJ (red.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, s. 967– 971
- Weisburg W G, Barns SM, Pelletier DA, Lane D J (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriolo 173:697-703.

## 7 APPENDIKS

### 7.1 Medier

#### **Blod Agar (BA), 15‰ NaCl**

Reagenser	Mengde	Leverandør
Nutrient Agar	28 g	Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, England
NaCl	10 g	
Dest. H <sub>2</sub> O	1000 ml	
Saueblod i CPD-adenin	50 ml	TCS Biosciences Ltd, Botolop, Claydon, Buckingham, UK

#### **Marine Agar (MA)**

Reagenser	Mengde	Leverandør
Marin Agar 2216	55,1 g	Difco, OneMed AS
Dest. H <sub>2</sub> O	1000 ml	

#### **Muller Hinton Agar (MHA)**

Reagenser	Mengde	Leverandør
MHA		Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England
Dest. H <sub>2</sub> O	1000 ml	

#### **Tryptone Citrate Bile Salt Agar (TCBS)**

Reagenser	Mengde	Leverandør
TCBSA	88 g	Merck
Dest. H <sub>2</sub> O	1000 ml	

#### **Marine Broth (MB)**

Reagenser	Mengde	Leverandør
Marin Broth 2216	37,4 g	Difco, OneMed AS
Dest. H <sub>2</sub> O	1000 ml	

#### **Tryptone Soy Broth (TSB)**

Reagenser	Mengde	Leverandør
Tryptone Soy Broth	30 g	Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England
Dest. H <sub>2</sub> O	1000 ml	





### 7.3 Rådata fra hovedforsøk

**Tabell 19:** Rådata fra dødelighet i badsmitteforsøk ved *V. anguillarum*-stammer HI 21413, HI 21429 og HI 610, samt negativ usmittet kontroll. Tre replikate kar per gruppe. Tabellen viser antall døde fisk per kar, for hver dag i smitteforsøket.

KAR	L4/A4	L5/A1	L5/A2	L5/A3	L5/A4	L5/A5	L5/A6	L5/A7	L5/A8	L4/A1	L4/A2	L4/A5
	HI 610	HI 610	HI 610	HI21413	HI21413	HI21413	HI21429	HI21429	HI21429	Kont.	Kont.	Kont.
26.sep												
27.sep							1					
28.sep												
29.sep	1	3	7									
30.sep	7	8	6	1	2			2				
01.okt	5	6	6	1		1		1				
02.okt	1	2	4			1		1	2			
03.okt	2	2	1				1	1	1		1	
04.okt	2	1	1				2					
05.okt	1					1			1			
06.okt										1		1
07.okt		1		1								
08.okt				1					1			
09.okt				1	1					1		
10.okt							1	1				1
11.okt				1			1		1	1		1
12.okt												
13.okt									1			
14.okt							1					
15.okt				1								
16.okt												
17.okt									1			
18.okt								1		1		
19.okt											1	
20.okt							1	1				1
21.okt												
22.okt							1					
<b>SUM</b>	<b>19</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Totalt</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

**Tabell 20:** Kumulativ dødelighet for hvert kar i de fire gruppene, gjennom hele forsøket.

	L4/A4	L5/A1	L5/A2	L5/A3	L5/A4	L5/A5	L5/A6	L5/A7	L5/A8	L4/A1	L4/A2	L4/A5
	HI 610	HI 610	HI 610	HI21413	HI21413	HI21413	HI21429	HI21429	HI21429	Kont.	Kont.	Kont.
<b>26.sep</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>27.sep</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>28.sep</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>29.sep</b>	3,33	10,00	21,88	0,00	0,00	0,00	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>30.sep</b>	26,67	36,67	40,63	3,33	6,90	0,00	3,33	6,90	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>01.okt</b>	43,33	56,67	59,38	6,67	6,90	4,00	3,33	10,34	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>02.okt</b>	46,67	63,33	71,88	6,67	6,90	8,00	3,33	13,79	6,90	0,00	0,00	0,00
<b>03.okt</b>	53,33	70,00	75,00	6,67	6,90	8,00	6,67	17,24	10,34	0,00	3,33	0,00
<b>04.okt</b>	60,00	73,33	78,13	6,67	6,90	8,00	13,33	17,24	10,34	0,00	3,33	0,00
<b>05.okt</b>	63,33	73,33	78,13	6,67	6,90	12,00	13,33	17,24	13,79	0,00	3,33	0,00
<b>06.okt</b>	63,33	73,33	78,13	6,67	6,90	12,00	13,33	17,24	13,79	3,33	3,33	3,33
<b>07.okt</b>	63,33	76,67	78,13	10,00	6,90	12,00	13,33	17,24	13,79	3,33	3,33	3,33
<b>08.okt</b>	63,33	76,67	78,13	13,33	6,90	12,00	13,33	17,24	17,24	3,33	3,33	3,33
<b>09.okt</b>	63,33	76,67	78,13	16,67	10,34	12,00	13,33	17,24	17,24	6,67	3,33	3,33
<b>10.okt</b>	63,33	76,67	78,13	16,67	10,34	12,00	16,67	20,69	17,24	6,67	3,33	6,67
<b>11.okt</b>	63,33	76,67	78,13	20,00	10,34	12,00	20,00	20,69	20,69	10,00	3,33	10,00
<b>12.okt</b>	63,33	76,67	78,13	20,00	10,34	12,00	20,00	20,69	20,69	10,00	3,33	10,00
<b>13.okt</b>	63,33	76,67	78,13	20,00	10,34	12,00	20,00	20,69	24,14	10,00	3,33	10,00
<b>14.okt</b>	63,33	76,67	78,13	20,00	10,34	12,00	23,33	20,69	24,14	10,00	3,33	10,00
<b>15.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	23,33	20,69	24,14	10,00	3,33	10,00
<b>16.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	23,33	20,69	24,14	10,00	3,33	10,00
<b>17.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	23,33	20,69	27,59	10,00	3,33	10,00
<b>18.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	23,33	24,14	27,59	13,33	3,33	10,00
<b>19.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	23,33	24,14	27,59	13,33	6,67	10,00
<b>20.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	26,67	27,59	27,59	13,33	6,67	13,33
<b>21.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	26,67	27,59	27,59	13,33	6,67	13,33
<b>22.okt</b>	63,33	76,67	78,13	23,33	10,34	12,00	30,00	27,59	27,59	13,33	6,67	13,33

**Tabell 21:** Kumulativ dødelighet hver gruppe, etter sammenslåing av dødelighetsdata fra hver av de replikate karene, for hver dag i smitteforsøket (d.e.s.= dager etter smitte).

dato	d.e.s.	HI 21413 (gruppe 1)	HI 21429 (gruppe 2)	Vibrio 610 (gruppe 3)	Kontroll (gruppe 4)
26.sep	0	0,00	0,00	0,00	0,00
27.sep	1	0,00	1,14	0,00	0,00
28.sep	2	0,00	1,14	0,00	0,00
29.sep	3	0,00	1,14	11,96	0,00
30.sep	4	3,70	3,41	34,78	0,00
01.okt	5	5,56	4,55	53,26	0,00
02.okt	6	7,41	7,95	60,87	0,00
03.okt	7	7,41	11,36	66,30	1,11
04.okt	8	7,41	13,64	70,65	1,11
05.okt	9	9,26	14,77	71,74	1,11
06.okt	10	9,26	14,77	71,74	3,33
07.okt	11	9,26	14,77	72,83	3,33
08.okt	12	9,26	15,91	72,83	3,33
09.okt	13	11,11	15,91	72,83	4,44
10.okt	14	11,11	18,18	72,83	5,56
11.okt	15	11,11	20,45	72,83	7,78
12.okt	16	11,11	20,45	72,83	7,78
13.okt	17	11,11	21,59	72,83	7,78
14.okt	18	11,11	22,73	72,83	7,78
15.okt	19	11,11	22,73	72,83	7,78
16.okt	20	11,11	22,73	72,83	7,78
17.okt	21	11,11	23,86	72,83	7,78
18.okt	22	11,11	25,00	72,83	8,89
19.okt	23	11,11	25,00	72,83	10,00
20.okt	24	11,11	27,27	72,83	11,11
21.okt	25	11,11	27,27	72,83	11,11
22.okt	26	11,11	28,41	72,83	11,11

## 7.4 Signifikante forskjeller mellom gruppene i badsmitteforsøk

**Tabell 22:** Yates-corrected Chi-square ( $\chi^2$ ) verdi og p-verdi ( $p < 0,05$ ) for individuell 2x2 tilfeldighets tabell for dødelighet hos testisolater og kontrollisolater. Alle signifikante p-verdier er merket med **fet tekst**. Dag = dag etter smitte. HI 610, HI 21413, HI 21429 = *V. anguillarum*-isolater.

	Dag 1		Dag 2		Dag 3		Dag 4		Dag 5		Dag 6	
<u>Gruppe</u>	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
1 mot 2	0,06	0,8045	0,06	0,8045	0,06	0,8045	0,14	0,7066	0,02	0,8971	0,04	0,8376
1 mot 3					5,37	<b>0,0205</b>	16,70	<b>0,0000</b>	31,72	<b>0,0000</b>	38,00	<b>0,0000</b>
1 mot 4							1,22	0,2700	2,75	0,0975	4,39	<b>0,0362</b>
2 mot 3	0,00	0,9910	0,00	0,9910	6,81	<b>0,0091</b>	26,30	<b>0,0000</b>	49,06	<b>0,0000</b>	53,06	<b>0,0000</b>
2 mot 4	0,00	0,9910	0,00	0,9910	0,00	0,9910	1,40	0,2363	2,37	0,1236	5,50	<b>0,0191</b>

	Dag 7		Dag 8		Dag 9		Dag 10		Dag 11		Dag 12	
<u>Gruppe</u>	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
1 mot 2	0,23	0,6328	0,75	0,3864	0,49	0,4846	0,49	0,4846	0,49	0,4846	0,77	0,3810
1 mot 3	45,43	<b>0,0000</b>	52,10	<b>0,0000</b>	50,70	<b>0,0000</b>	50,70	<b>0,0000</b>	52,49	<b>0,0000</b>	52,49	<b>0,0000</b>
1 mot 4	2,33	0,1266	2,33	0,1266	3,76	0,0526	1,27	0,2597	1,27	0,2597	1,27	0,2597
2 mot 3	54,56	<b>0,0000</b>	57,43	<b>0,0000</b>	56,98	<b>0,0000</b>	56,98	<b>0,0000</b>	59,06	<b>0,0000</b>	56,59	<b>0,0000</b>
2 mot 4	5,57	<b>0,0183</b>	8,54	<b>0,0035</b>	9,65	<b>0,0019</b>	5,79	<b>0,0161</b>	5,79	<b>0,0161</b>	6,76	<b>0,0094</b>

	Dag 13		Dag 14		Dag 15		Dag 16		Dag 17		Dag 18	
<u>Gruppe</u>	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
1 mot 2	0,30	0,5827	0,79	0,3726	1,47	0,2257	1,47	0,2257	1,86	0,1723	2,29	0,1300
1 mot 3	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>
1 mot 4	1,40	0,2360	0,79	0,3729	0,14	0,7074	0,14	0,7074	0,14	0,7074	0,14	0,7074
2 mot 3	56,59	<b>0,0000</b>	51,87	<b>0,0000</b>	47,42	<b>0,0000</b>	47,42	<b>0,0000</b>	45,29	<b>0,0000</b>	43,22	<b>0,0000</b>
2 mot 4	5,23	<b>0,0222</b>	5,66	<b>0,0174</b>	4,92	<b>0,0266</b>	4,92	<b>0,0266</b>	5,74	<b>0,0166</b>	6,61	<b>0,0101</b>

Gruppe	Dag 19		Dag 20		Dag 21		Dag 22		Dag 23		Dag 24	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
1 mot 2	2,29	0,1300	2,29	0,1300	2,75	0,0970	3,25	0,0715	3,25	0,0715	4,32	<b>0,0377</b>
1 mot 3	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>
1 mot 4	0,14	0,7074	0,14	0,7074	0,14	0,7074	0,02	0,8845	0,00	0,9438	0,08	0,7842
2 mot 3	43,22	<b>0,0000</b>	43,22	<b>0,0000</b>	41,21	<b>0,0000</b>	39,27	<b>0,0000</b>	39,27	<b>0,0000</b>	35,54	<b>0,0000</b>
2 mot 4	6,61	<b>0,0101</b>	6,61	<b>0,0101</b>	7,51	<b>0,0061</b>	7,13	<b>0,0076</b>	5,96	<b>0,0147</b>	6,51	<b>0,0107</b>

Gruppe	Dag 25		Dag 26	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
1 mot 2	4,32	<b>0,0377</b>	4,90	<b>0,0269</b>
1 mot 3	49,40	<b>0,0000</b>	49,40	<b>0,0000</b>
1 mot 4	0,08	0,7842	0,08	0,7842
2 mot 3	35,54	<b>0,0000</b>	33,76	<b>0,0000</b>
2 mot 4	6,51	<b>0,0107</b>	7,37	<b>0,0066</b>

## 7.5 Contig i BLAST fra: 16S RNA og gyraseB-gen

**Tabell 23:** Contig av nukleotidsekvenser fra 16S rRNA-genet til de isolerte stammene fra død og levende fisk gjennom hele eksperimentet. *Vibrio anguillarum*-lignende isolater er merket med **gult**.

Contig:	Prøve	Kode:	Isolat:	Likhet:	Organ, Lab/kar:
1	P1	DQ340191	Uncultured <i>Vibrio</i> sp. Clone (7 16Sriboso. RNA gene)	99 %	Gjellelokk, P1
2	p. 6	FJ456751	Uncultured bacterium clone A092_NCI 16S ribosomal RNA gene	99 %	muskel L5/A5
3	p. 7	DQ492722	<i>Vibrio</i> sp. BSi20140	100 %	muskel L5/A5
4	p. 8	EU091331	<i>Vibrio splendidus</i> isolat PBI-10rrnG	99 %	Milt, L5/A8
5	p. 9	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	nyre, F 1/K3,
6	p. 10	AY292934.1	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	muskel, F1/K5,
7	p. 15	EF064157.1	<i>Listonella anguillarum</i> strain 06/09/23	99 %	Nyre, L5/A7
8	p. 22	EF091702	<i>Listonella anguillarum</i> strain SMP1	99 %	muskel hale, L5/A5
9	p. 28	EU195932.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. P108	99 %	nyre, L5/A7
10	p. 29	EF091702	<i>Listonella anguillarum</i> strain SMP1	99 %	muskel, L5/A8
11	P5	EU091332	<i>Vibrio splendidus</i> isolat PB1-10rrnH	99 %	muskel, L5/A5
12	p. 33	FJ362493	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.41-2	99 %	hud, F2/K 3
13	p. 34	EU091326	<i>Vibrio</i> sp. BSi20140	99 %	Pilot, nyre, 10 <sup>4</sup> ,
14	p. 36	AM422807	<i>Vibrio splendidus</i> partial	99 %	nyre, L5/A7, grønn hemolyse
15	p. 38	EF091702	<i>Listonella anguillarum</i> strain SMP1	99 %	nyre, L5/A8
16	p. 39	AY292934	<i>Vibrio logei</i> SR181	99 %	nyre, L5/A4
17	p. 41	AY292934	<i>Vibrio logei</i> SR181	99 %	gjelle, F2/K 3
18	p. 44	EU195932	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.P108	99 %	nyre, L5/A7
19	p. 45	AB095446	<i>Photobacterium phosphoreum</i> gene	99 %	L5/A4, HI21413
20	p. 46	EF091702	<i>Listonella anguillarum</i> strain SMP1	99 %	Muskel, L5/A5,
21	p. 47	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	L5/A4, HI21413
22	p. 48	AM990725	<i>Vibrio</i> sp. MOLA 500 partial	99 %	nyre, L5/A3
23	p. 49	AM933562	Uncultured <i>photobacterium</i> sp. Partial	99 %	gjellelokk, F2/K 3,
24	p. 50	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	pilot, 10 <sup>5</sup> , HI21413
25	p. 51	FJ457248.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. S4741	99 %	nyre, L5/A1
26	p. 52	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	halemuskel, L5/A7
27	p. 53	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	muskel, L5/A8
28	p. 54	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	nyre, L5/A8
29	p. 56	DQ492722	<i>Vibrio</i> sp. BSi20140	99 %	nyre, L5/A3
30	p. 57	AY292949	<i>Vibrio fischeri</i> strain SI1E	99 %	nyre, F2/K 3
31	p. 63	EU091328	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnD	99 %	muskel, L5/A8
32	p. 64	FJ386506	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. L10	99 %	nyre, L5/A6
33	p. 70	EU091324	<i>Vibrio salmonisida</i> isolate PB1-8rrnB	99 %	nyre, L5/A4
34	p. 73	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	nyre, Fisk 3/kar 3,
35	p. 74	AJ 746359	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	99 %	nyre, L5/A8
36	p. 76	EU091323	<i>Vibrio salmonisida</i> isolate PB1-8rrnB	99 %	finne, L5/A2
37	p. 78	EY292932.1	<i>Vibrio logei</i> strain 15382	99 %	nyre, L5/A8
38	p. 83	FJ025776	<i>Vibrio</i> sp. Sx2wb	99 %	finne, L5/A4
39	p. 85	EU091332	<i>Vibrio splendidus</i> isolat PB1-10rrnH	99 %	nyre, L4/A5
40	p. 86	EU091332.1	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnH	99 %	L5/A8, nyre
41	p. 87	EU091332.1	<i>Vibrio splendidus</i> isolate PB1-10rrnH	99 %	milt, L5/A3
42	p. 88	EF064157	<i>Listonella anguillarum</i> strain 06/09/23	99 %	milt, L5/A7
43	P12	AY292934	<i>Vibrio logei</i> strain SR181	99 %	øye, F1/K5
44	P25	AY292932	<i>Vibrio logei</i> strain 15382	99 %	10 <sup>7</sup> , HI21413
45	p.93	EF064157.1	<i>Listonella anguillarum</i> strain 06/09/23	99 %	milt, L5/A5
46	p. 95	EU091324.1	<i>Vibrio salmonicida</i> isolate PB1-8rrnB	98 %	nyre, L5/A8
47	p. 96	EU091331	<i>Vibrio splendidus</i> isolat PB1-10rrnG	99 %	muskel, L5/A7

**Tabell 24:** Contig av nukleoidsekvenser på *GyraseB*-gen til de isolerte stammene fra død og levende fisk gjennom hele eksperimentet. *Vibrio anguillarum*-lignende isolater er merket med gult

Contig: Prøve	Kode:	Isolat:	Likhet:	Organ, Lab/kar:	
1	H57	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Milt, L5/A8
2	P2	AM235736.2	<i>Listonella anguillarum</i> partial	98 %	Nyre, F1/K3
3	H13	AY849442.1	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	99 %	Nyre, L5/A7
4	P17	EF380261.1	<i>Vibrio splendidus</i> strain ATCC 33125	99 %	Nyre, fisk som ovelevde.
5	H37	EF380257.1	<i>Vibrio wodanis</i> strain ATCC BAA-104	95 %	Nyre, L5/A7
6	H49	EF380257.1	<i>Vibrio wodanis</i> strain ATCC BAA-104	96 %	Nyre, L5/A4
7	H15	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A7
8	H51	AY849442.1	<i>Photobacterium phosphoreum</i> strain FS-3.1	99 %	Nyre, L5/A8
9	H04	EF534724.1	<i>Listonella anguillarum</i> clone 04/09/494-5106	100 %	Nyre, L5/A1
10	H61	AY849442.1	<i>Photobacterium phosphoreum</i> strain FS-3.1	99 %	Nyre, L5/A6
11	H62	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L4/A3
12	H63	AF007274.1	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	98 %	Nyre, L5/A6
13	H41	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L4/A5
14	P10	AM235736.2	<i>Listonella anguillarum</i> partial	98 %	Nyre, 3/K3
15	H80	EF415524.1	<i>Photobacterium kishitanii</i> strain NCIMB 1276	89 %	Nyre, L5/A8
16	H43	AY849479.1	<i>Photobacterium iliopiscarium</i> strain NCIMB 13481	99 %	Nyre, L5/A8
17	H32	AY849478.1	<i>Photobacterium iliopiscarium</i> strain NCIMB 13478	89 %	Milt, L5/A5
18	H56	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	100 %	Nyre, L5/A8
19	H68	EF380257.1	<i>Vibrio wodanis</i> strain ATCC BAA-104	96 %	Milt, L5/A4
20	H89	AB490498.1	<i>Psychrobacter</i> sp. JCM 15603	87 %	Milt, L5/A8
21	H43	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A8
22	H138	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A5
23	H70	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A4
24	H82	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A3
25	H72	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A3
26	H84	AY849442.1	<i>Photobacterium phosphoreum</i> strain FS-3.1	99 %	Nyre, L5/A3
27	H86	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A8
28	H98	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A7
29	H123	AY849478.1	<i>Photobacterium iliopiscarium</i> strain NCIMB 13478	90 %	Nyre, L5/A2
30	HI21413	AM235736.2	<i>Listonella anguillarum</i> partial <i>gyrB</i> gene for gyrase B protein, strain NCMB 6	99 %	Kontroll
31	HI21429	AM235736.2	<i>Listonella anguillarum</i> partial <i>gyrB</i> gene for gyrase B protein, strain NCMB 6	98 %	Kontroll
32	H135	EF380255.1	<i>Vibrio logei</i> strain ATCC 29985	96 %	Nyre, L5/A3
33	H610	EF380257.1	<i>Vibrio wodanis</i> strain ATCC BAA-104	96 %	Kontroll
34	P11	CP000931.1	<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4, complete genome	92 %	Øye, F3/K3



## 7.6 Reisolerte *Vibrio anguillarum* stammer fra smitteforsøk:

**Tabell 25:** Reisolerte *Vibrio (Listonella) anguillarum* isolater fra hodenyre på smittet torskeyngel, funnet fra sekvenser i Blast Basic Alignment Search Tool Local. Tabellen omtaler stammene som *Listonella anguillarum* ettersom dette navnet er lagt inn i genbanken.

Prøve	Stamme	Sekvens gen:	Identitet (%)	Ligner:	Accession nr.
15	HI 21429	16S -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF064157.1
22	HI 21429	16S -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF091702.1
29	HI 21413	16S -gen	99 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF091702.1
38	HI 21413	16S -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF091702.1
46	HI 21429	16S -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF091702.1
88	HI 21429	16S -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF064157.1
93	HI 21429	16S -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF064157.1
HI 21413	Kontroll	16S -gen	99 %	<i>Listonella anguillarum</i>	AY963631.1
HI 21429	Kontroll	16S -gen	99 %	<i>Listonella anguillarum</i>	AY963631.1
P2	HI21413	<i>gyrB</i> -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	AM235736.2
04	HI 610	<i>gyrB</i> -gen	100 %	<i>Listonella anguillarum</i>	EF534724.1
P10	HI21413	<i>gyrB</i> -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	AM235736.2
HI 21413	Kontroll	<i>gyrB</i> -gen	99 %	<i>Listonella anguillarum</i>	AM235736.2
HI 21429	Kontroll	<i>gyrB</i> -gen	98 %	<i>Listonella anguillarum</i>	AM235736.2

**Tabell 26:** *Vibrio anguillarum* isolat reisolert fra død fisk i hovedforsøk; tid for død etter smitte, vekt på fisk, andre bemerkninger. Prøve Hxx = Hovedforsøk, Prøve Pxx = Pilotforsøk. Prøver merket med **grønt** gav grønn hemolyse på blod-agar.

Prøve	Isolat	Død etter smitte	Vekt	Annet	Isolert fra
H22	HI 21429	dag 9	12,8 g	Lys i hud, rød på hale og gjellelokk	Nyre
<b>H38</b>	<b>HI 21413</b>	<b>dag 9</b>	<b>17,8 g</b>	<b>Oppspist buk</b>	<b>Muskel</b>
H93	HI 21429	dag 24	?	Oppspist buk, mangler øye	Milt
H15	HI 21429	dag 7	12,3 g	-	Nyre
<b>H29</b>	<b>HI 21413</b>	<b>dag 13</b>	<b>19,7 g</b>	<b>Makk i magen</b>	<b>Muskel</b>
H46	HI 21429	dag 15	14,1 g	Oppspist, manglet øye	Nyre
H88	HI 21429	dag 21	17,8 g	Mangler kjeve og øyne	Milt
<b>P2</b>	<b>HI 21413</b>	<b>Dag 4</b>	<b>?</b>	<b>Mørk, eksoftalmi</b>	<b>Nyre</b>
<b>P10</b>	<b>HI 21413</b>	<b>Dag 14</b>	<b>?</b>	<b>Mørk, eksoftalmi</b>	<b>Nyre</b>
H04	HI 610	Dag 3	?	Rød på hode, gjellelokk	Nyre