



NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for basalfag og akvamedisin
Seksjon for akvamedisin og ernæring

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2019, 20 stp

Akvamedisin

Karakterisering av ulike *Tenacibaculum* spp. isolater fra atlantisk oppdrettslaks med snutesår og vurdering av ulike risikofaktorer for utvikling av sykdom.

Characterization of *Tenacibaculum* spp. isolates from Atlantic farmed salmon and evaluation of different risk factors prior to tenacibaculosis.

Maren Fagerheim og Linn Beate Petersen Onsrud
Kull 2013

Øystein Evensen og Saurabh Dubey

Innhold

Sammendrag.....	4
Definisjoner og forkortelser	5
Innledning.....	6
Norsk oppdrettsnæring.....	6
Helsemessige utfordringer.....	6
<i>Tenacibaculum</i> spp.....	7
Etiologi og patogenese.....	8
Profylakse og behandling.....	10
Mål med studien.....	11
Materiale og metode.....	11
Materiale - del 1.....	11
Metode - del 1.....	12
Biokjemiske metoder.....	13
Molekylære metoder.....	18
Materiale og metode del - 2.....	23
Resultater.....	23
Resultater - del 1.....	23
Resultater - del 2.....	43
Diskusjon.....	47
Karakterisering av <i>Tenacibaculum</i> spp.....	47
Vurdering av risikofaktorer for utvikling av tenacibaculose.....	49
Begrensninger og generaliserbarhet.....	52
Konklusjon.....	54

Takk til bidragsytere.....	55
Summary	55
Referanser.....	57
Vedlegg	60
Følgeskjema til spørreundersøkelse.....	60
Spørreundersøkelse.....	62
API avlesningstabell.....	65

Sammendrag

Tittel: Karakterisering av ulike *Tenacibaculum* spp. fra atlantisk oppdrettslaks med snutesår og vurdering av ulike risikofaktorer for utvikling av sykdom.

Forfattere: Maren Fagerheim og Linn Beate Petersen Onsrud

Veiledere: Øystein Evensen, og Saurabh Dubey

Norges miljø- og biovitenskapelig universitet, Fakultet for veterinærmedisin,
Institutt for basalfag og akvamedisin

Tenacibaculose er en viktig årsak til munnerosjoner i over- og underkjeven hos atlantisk laks. Sykdommen forårsakes av *Tenacibaculum* spp. som er et relativt nyoppdaget bakteriegenus som er forholdsvis lite karakterisert og lite studert i samband med infeksjon hos laksefisk. Bakteriens virulens og patogenese er fortsatt ikke helt kjent og ulike forskningsprosjekter er iverksatt for å tilegne seg mer kunnskap om bakterien. Formålet med studien er derfor å karakterisere bakterien gjennom en laboratoriedel, samt undersøke mulige faktorer som kan knyttet til forekomst av sykdom gjennom en spørreundersøkelse. For å lære mer om bakterienes egenskaper har vi utført ulike biokjemiske og molekylære tester med *Tenacibaculum finnmarkense* og *Tenacibaculum maritimum*. Testene viste at begge *Tenacibaculum* spp. vokser i sirkulære kolonier, de er Gram-negative staver som videre er oksidase positive og indol negative. Bakteriene har flere ervervede resistensmekanismer som det er viktig å ta høyde for før det iverksettes en eventuell behandling.

For å kartlegge mulige risikofaktorer for sykdom ble det sendt ut et spørreskjema til oppdrettsanlegg som tidligere har hatt sykdommen på anlegget. Via spørreskjemaet kunne vi konkludere med at de viktigste risikofaktorene er utsett på kalde og fallende vanntemperaturer. Siden sykdom gjerne oppstår i ukene rett etter utsett er det viktig at man unngår eller reduserer faktorer som kan stresse fisken i denne perioden.

Definisjoner og forkortelser

Snutesår: I denne oppgaven definerer vi snutesår som sår i snuteområde forårsaket av *Tenacibaculum* spp.

Smoltifisering: Endringer i ytre morfologi og kompliserte fysiologiske forandringer som tilpasser laksen til livet i sjøvann

Smolt: Unglaks som har gjennomgått smoltifisering og er klare for utvandring fra ferskvann til saltvann.

0-åring: Smolt yngre enn 1 år ved sjøsetting. Sjøsettes på høsten, samme året som de klekkes

1-åring: Smolt eldre enn 1 år. Sjøsettes på våren, året etter de klekkes

Postsmolt: Fra fisken er sjøtilvendt og den første tiden i påvekstfasen på saltvannsanlegget

Kromogenese: Metabolsk bakteriell produksjon av fargeendring eller pigment

Pin point bakteriekolonier: Punktformede kolonier av bakterier <1 mm

Salinitet: Saltinnhold i vannet. Oppgis vanligvis i promille.

Vintersår: Sykdom som gir sårutvikling på fisk, forårsaket av bakterien *Moritella viscosa*

Innledning

Norsk oppdrettsnæring

Fisk er Norges største, fornybare eksportnæring og Norge er verdensledende innen oppdrett av atlantisk laks. Europa er det dominerende markedet for eksport per idag, men med en stadig økende eksport til både Asia og USA (1). I Norge er driften for laks og regnbueørret og fordelt på 1015 lokaliteter. Det produseres 1 236.353 tonn laks årlig til en verdi som overstiger 61,6 milliarder kroner (2). Det er et stort fokus på bærekraftig utvikling i samråd med å utnytte ressursene fra havet. Med økt produksjon vil konsekvensen nødvendigvis være økt smittepress for oppdrettsfisken samt ulike miljøutfordringer for kystøkosystemet. For havbruksnæringen viser en risikorapport at lakselus og rømming er de to største miljøutfordringene (3).

Helsemessige utfordringer

Oppdrettsnæringen i Norge står også ovenfor en rekke helsemessige utfordringer, og noen er større enn andre. Den største utfordringen i dag er lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*). Lakselus har lenge vært et problem for næringen, og ettersom resistensutvikling mot medikamenter benyttet for å kontrollere parasitten ble mer og mer utbredt har man utviklet ulike ikke-medikamentelle metoder. Disse metodene har derimot vist seg som svært stressende for fisken, samt kunne føre til både ytre og indre skader. Generelt sett kan dette gi en svekkelse av immunforsvaret, og de ytre skadene kan videre fungere som en inngangsport for patogene agens. Hovedproblemet er med andre ord ikke bare luseinfeksjonen i seg selv, men også metodene som benyttes for avlusning. Foruten lakselus er det virussykdommer slik som for eksempel kardiomyopatisyndrom (CMS), pankreassykdom (PD) og hjerte og skjelettmuskulaturbetennelse (HSMB) som preger sykdomsbildet i dagens oppdrettsnæring. Totalt sett er situasjonen for bakteriesykdommer hos oppdrettet laksefisk relativt god og stabil (4). Mange av de bakterielle sykdommene kontrollerer man i stor grad ved hjelp av vaksiner,

og vaksineringsanses som et av de viktigste årsakene til at antibiotikaforbruket er lavt i oppdrettsnæringen i Norge. Likevel representerer bakterielle sårbakterier fremdeles et velferdsproblem. Sårutvikling i sjøfasen medfører både redusert velferd, økt dødelighet, og redusert kvalitet ved slakting. Sårtilstander kan deles inn i to hovedtyper:

- Klassiske vintersår er den vanligste typen og er hovedsakelig forbundet med bakterien *Moritella viscosa*. Andre bakterier slik som *Vibrio spp.*, og *Tenacibaculum spp.* kan også påvises i forbindelse med sykdom. Klassisk vintersår gir sårutvikling først og fremst på sidene av fisken, men *Moritella viscosa* kan også gi systemiske infeksjoner.
- Ikke-klassiske vintersår, også kalt tenacibaculose er mindre vanlig, men alvorlig når det forekommer. Affisert fisk utvikler dype sår rundt kjeve, hode, hale og finner (4).

Det er utfordrende å estimere nøyaktig antall tilfeller av klassisk og ikke-klassisk vintersår fordi ingen av lidelsene er meldepliktige. Sykdommene påvises langs hele norskekysten, men det registreres flest tilfeller i Nord-Norge. En viktig årsak til dette er lavere vanntemperaturer i disse områdene. Sårutvikling oppstår hyppigere ved sjøtemperaturer under 7 °C (5), og dermed ser man oftest sykdom på tidlige vårutsett av 1 åringer, og sene høstutsett av 0-åringer.

Tenacibaculum spp.

Tenacibaculum spp. er et relativt nyopplaget bakteriegenus, som tilhører familien *Flavobacteriaceae* og er tynne Gram-negative, trådformede, motile bakterier (5). Bakterien kan ofte observeres ved direkte mikroskopi av skrap fra såret. Det kan være noe vanskelig å dyrke bakterien på laboratoriet, og dette kan føre til en underestimert antall sykdomstilfeller (4). Bakterieslekten er marin, og overlever vanligvis ikke ved salinitet under 19-24‰ (6). Forskning viser en høy grad av genetisk variasjon blant tenacibaculum-bakteriene som blir påvist i sår (4). Fremdeles er ikke alle beskrevet, men 3 arter har man sett i forbindelse med sårutvikling hos

laks; *T. maritimum*, *T. finnmarkense* og *T. dicentrarchi* (7). Utbrudd i Nord- Norge er oftest assosiert med *T. finnmarkense* eller nært beslektede stammer (7).

Etiologi og patogenese

Bakteriene smitter horisontalt, men selve smitteårsaken er foreløpig ukjent. Noen antar at høye bakteriekonsentrasjoner i vannet ved utsett er nok til å smitte fisken, andre mener at bakterien kun er en sekundærpatogen som er avhengig av at hudbarrieren allerede er svekket (5). Typiske utbrudd med *Tenacibaculum* spp. Infeksjon varer som regel i 14 dager. I de første 7 dagene ses økt dødelighet, mens i de 7 siste dagene ses avtagende dødelighet (5).

Sårutvikling ses hyppigst hos nyutsatt smolt, men fisk i alle størrelser kan affiseres. Man antar at utbrudd særlig hos stor fisk gjerne oppstår i etterkant av ulike former for håndtering, eksempelvis avlusning og transportering. Dette er både grunnet økt mengde stress for fisken, men også fordi hudbarrieren kan skades under håndteringen. Hos postsmolt antar man at også endringer i hudens mikrobiota, og fysiologiske endringer som oppstår når fisken overføres fra ferskvann til sjøvann også har en innvirkning på utvikling av sykdom (7).

Tenacibaculose fører hovedsakelig til munnerosjoner i over- og underkjeven, samt ulcerative hudlesjoner. I et forsøk utført med badesmitte av en høy dose canadisk *T. maritimum* ble det observert at de kliniske tegnene ikke var forbeholdt kun munnregionen, men også gjeller og hud var affisert. At gjellene også affiseres har blitt observert ved to andre forsøk med badesmitte i henholdsvis Tasmania og California (8). I forsøket gjort i Nord-vest USA antydes det at mulig årsak at *T. maritimum* sin særlige affinitet til tenner og omkringliggende slimhinne(r) skyldes bakteriens affinitet til kalsium. Videre viser *T. maritimum* en sterk bindingsevne til hydrofobe overflater, inkludert slimhinner hos fisk. Denne evnen til å binde seg og kolonisere er et viktig

første steg for en patogen bakterie for å invadere en vert. Dette er sannsynligvis årsaken til at *T. maritimum* har evnen til effektivt å danne biofilm (8). Dette kan igjen forklare hvorfor man generelt observerer moderat lokal immunrespons ved munnråde, da bakterien er beskyttet i biofilmen. Videre, i det eksperimentelle forsøket ble RT-PCR benyttet og funn av bakterien ble oppdaget i blant annet nyre, som indikerer at infeksjonen går systemisk. Sannsynlig inngangsport til det kardiovaskulære systemet kan være den vaskulerte tannpulpaen når tilstrekkelig skade på dentinen etter infeksjon. Denne hypotesen ligner det som allerede er beskrevet hos pattedyr med periodontale skader. Selv om det er bevist i forsøk at bakterien kan gå systemisk er det hovedsakelig ytre sårskader som er typisk for tenacibaculose. Diagnostiske metoder for verifisering av tenacibaculose er hovedsakelig PCR og histopatologi (8).



Figur 1: Typiske lesjoner i munnregionen. Bilde fra Marin Helse.

Tenacibaculum spp. angriper ikke bare laksefisk, men er påvist både på regnbueørret, kveite, piggvar, berggylt, leppefisk og rognkjeks. Hos oppdrettet berggylt har man observert at bakterien blant annet kan føre til finneråte. Hos rognkjeks har man påvist bakterien ved tilfeller

av «kratersyken», men det er fremdeles usikkert om *Tenacibaculum* spp. er hovedårsaken til forandringene (4).

Profylakse og behandling

Effektiv sykdomsbekjempelse mot tenacibaculose vil ikke bare være fordelaktig for fisken, men kunne spare næringen for store summer. Det er ikke utbredt å bruke antibiotika i forbindelse med *Tenacibaculum* spp. utbrudd i Norge, dels på grunn av at sykdommen vanligvis ikke varer mer enn 14 dager, og effekten av antibiotika er dårlig (5). Dessuten er det observert en naturlig nedsatt følsomhet for oksolinsyre (9). I andre deler av verden er det derimot utbredt å bruke antibiotika mot sykdommen og i Nordvest- Stillehavet, er tenacibaculose den viktigste årsaken til antibiotikabruk (8).

Vellykkede vaksineprogrammer har vært helt avgjørende for bekjempelse av hovedsakelig bakterielle sykdommer, men det er fremdeles flere sykdommer man ikke har vaksine mot, for eksempel tenacibaculose. Det er gjort flere forsøk for å utvikle en vaksine mot sykdommen men foreløpig uten hell. Det planlagt forsøk for å utvikle vaksine mot *Tenacibaculum maritimum* ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Forebyggende helsearbeid er dermed helt essensielt når det gjelder tenacibaculose, siden det verken er vaksine eller gode behandlingsmetoder mot sykdommen. For å forebygge utbrudd er det viktig med kunnskap om mulige risikofaktorer for sykdom.

Målet med studien

Det er mye forskning som gjenstår for å fullstendig forstå bakterienes patogenese og etiologi. Formålet med denne fordypningsoppgaven er dermed å innhente mer kunnskap om henholdsvis *Tenacibaculum finnmarkense* og *Tenacibaculum maritimum*, både når det gjelder bakteriens

egenskaper, men også ulike faktorer som kan knyttes til sykdomsutvikling. Denne fordypningsoppgaven er derfor en todelt studie bestående av del 1; karakterisering av ulike *Tenacibaculum* spp. isolater, der delmålet innebærer å videre vurdere artsforskjeller mellom *Tenacibaculum finnmarkense* og *Tenacibaculum maritimum*. Del 2; belyse ulike risikofaktorer for utvikling av sykdom, med et delmål som omfatter hvordan utbrudd kan forebygges.

Materiale og metoder

Materiale - Del 1

Del 1 av oppgaven bygger på et analytisk, eksperimentell studie, herunder laboratorieeksperiment. Studiepopulasjonen er atlantisk laks i oppdrett fra matfiskanlegg i Norge. Bakterieisolatene som er brukt i denne studien er innhentet av Fish Vet Group fra laksefisk med kliniske symptomer på munnsår/snutesår og/eller hudsår, og fra følgende områder: 3 isolater fra Midt-Norge, isolert i 2018, ett fra Vestlandet, isolert i 2018 og 2 fra Nord-Norge, ett samlet inn i 2018 og ett i 2019. Bakterieisolatene ble dyrket opp i renkultur og prøvene som ble undersøkt bestod av de sju kjente bakterieisolater og et ukjent bakterieisolat. De sju kjente bakterieisolatene inkluderer to prøver av *Tenacibaculum maritimum* og fem prøver av *Tenacibaculum finnmarkense*. Den ukjente prøven er tatt fra hudsår på atlantisk laks i Norge.

Metoder – Del 1

Innledning til laboratoriearbeid

De 7 kjente bakterieisolatene benyttet i dette studiet har blitt lagret ved - 80°C i en måned før oppstart med labarbeidet. Lagringsmediet består av 70% LB- medium og 30 % glyserol. LB-medium er et næringsrikt medium, primært brukt for vekst av bakterier, glyserol for å beskytte bakterienes cellevegg mot krystallisering. Bakterioisolatet fra ukjent prøve er podet ut i forkant av laboratoriearbeid og lagret på marin agar ved 4°C i omtrent 2 uker før oppstart med labarbeidet.

Alle bakterieisolatene ble innledningsvis sådd ut på marin agar med eller uten kanamycin, 50 mg/L. Marin agar er tilsatt 3% NaCl for å optimalisere miljøet og fremme veksten av marine bakterier. Under inkubering ved 15 °C, ble prøvene beskyttet med plast for å hindre uttørking, og for å sikre god vekst.

Bakteriemorfologi

Bakteriene ble inkubert ved 15 grader i 5 dager på marin agar før visuell vurdering av morfologi. Bakteriens utseende ved vekst på agar ble vurdert med hensyn på form, størrelse, marginer, opasitet, kromogenese, elevasjon, overflate og konsistens.

Gramfarging

Gram-positive bakterier har en tykk cellevegg bestående av mye peptidoglykan, mens Gram-negative bakterier har en tynnere, mer komplisert cellevegg. Peptidoglykanlaget er en nettformet polymer av sukker og blant annet ulike aminosyrer som finnes hos både Gram-negative og Gram-positive bakterier. Hos Gram-negative bakterier er dette laget mye tynnere. De har i tillegg en yttermembran som består av lipopolysakkarider som er molekyler bygget

opp av lipider og polysakkarider. Veggen er komplekst oppbygget og innehar også poriner, såkalte kanalproteiner som gjør yttermembranen relativt permeabel for små molekyler.

En dråpe destillert vann ble avsatt på et objektglass. En bakteriekoloni ble plukket fra petriskål med podenål og blandet ut i det destillerte vannet, deretter fiksert med en gassflamme og avkjølt før farging. Preparatene ble først farget med Gram's crystal violet Solution i 60 sekunder. Krystallfiolett binder seg til peptidoglykanlaget. Deretter ble preparatene farget med Gram's iodine Solution i 60 sekunder. Dette er basiske grunnstoffer som bindes til sure grupper i bakteriens cellevegg og sammen danner et jodin-krystall kompleks. Avfarging med Gram's Decolorizer Solution (95 % etanol) i 30 sekunder. Under denne prosessen vil krystallfiolett-jodid vaskes ut av den permeable veggen til de Gram-negative bakteriene (10). Deretter ble preparatet farget med Gram's safranin Solution (10% Fuchsine) i 60 sekunder. Safranin er en kontrastfarge som gir de Gram-negative bakteriene en lys rød farge slik at de er enklere å se i mikroskopet. Hos Gram-positive bakterier vil jodin-krystall-komplekset bestå etter avfarging med etanol og de vil forbli fiolett i fargen. Det ble benyttet direkte lysmikroskopi (Leica mikroskop) for å se på snittene. Olje ble benyttet for bedre oppløsning/visualisering av bakteriene. Bakterienes farge og form ble vurdert.

Biokjemiske metoder

Hemolyse

Formålet med denne testen er å se om bakteriene vokser på blodskål og om de bryter ned de røde blodlegemene. Bakteriene ble sådd ut på blodskål tilsatt 2 % NaCl. Skålen ble inkubert i 6 dager ved 15 °C, før avlesning. Vekst og hemolyse ble vurdert. Vi skiller mellom α -hemolyse og β -hemolyse. α -hemolyse vil si en grågrønn misfarging rundt og under koloniene. β -hemolyse vil si en full oppløsning rundt og under koloniene(11).

Oksydase

Bakteriekolonier fra marin agar ble overført til en strips tilsatt en kunstig elektronakseptor. En annen metode er å bruke et filterpapir og tilsette den kunstige elektronakseptoren i væskeform på papiret. Begge metoder ble utført i dette studiet. Alle bakterier som er oksidase positive er aerobe bakterier, men ikke nødvendigvis strikt aerobe. Testen skiller bakterier med ingen og lav enzymaktivitet fra bakterier med moderat og høy aktivitet.

Et blått fargeomslag innen 30 sekunder betyr at testen er positiv. Dersom det ikke skjer et fargeomslag er testen negativ (11).

Katalase

Formålet med denne testen er å undersøke om bakterien produserer enzymet katalase. Bakteriekolonier ble overført til et objektglass og det ble tilsatt en dråpe hydrogenperoksid. Testen er positiv dersom man får en tydelig brusing av gass. Testen er negativ dersom det ikke dannes gassbobler (11).

Hugh og Leifson

Testen undersøker om bakterien kan spalte en sukkerart oksydativt og/eller fermentativt. Gult omslag tilsier positiv prøve, manglende fargeomslag ved negativt resultat. Positivt resultat for begge rør betyr at bakterien spalter sukkerarten oksydativt og fermentativt. Kun positiv reaksjon i rør uten parafinlukk betyr oksydativ sukkeromsetning(11). Bakteriekoloniene ble inokulert i to reagensrør tilsatt Hugh og Leifson medium, det ene røret ble tilsatt parafinolje på toppen. Røret uten parafin ble inkubert i en shaker ved 15 °C med en hastighet på 170 rpm, mens røret med parafin ble inkubert ved 15 °C (uten røring). Grunnet manglende bakterievekst etter 8 dagers inkubering, ble oppsettet gjentatt med en større mengde bakterier tilsatt. Testen ble avlest etter 12 dager.

Methyl Red-Voges Proskauer (MRVP)

Formålet med testen er å undersøke bakterienes evne til å danne syrer ved fermentering av glukose samt påvise enzymer som spalter disse syrene videre. Bakteriekolonier ble inokulert i Clark og Lubs medium og inkubert i inkubasjons-shaker ved 15 C° ved en hastighet på 170 rpm, to rør til hver bakterie. Grunnet manglende bakterievekst etter 8 dagers inkubering, ble testen gjentatt med en større mengde bakterier i nye rør. Etter 12 dager ble testen avlest. For Methyl-rødt testen ble 3-5 dråper metylrødt tilsatt i det ene røret for vurdering av fargeomslag. Syrene produsert fører til fall i pH og dette kan påvises ved tilsetning av metylrødt. pH under 4,4 gir rød farge, pH 5.0-5.8 gir oransje farge og pH over 6 gir gul farge. En positiv reaksjon gir rødt fargeomslag, en negativ reaksjon gir gult fargeomslag. I Voges-Proskauer testen ble 6 dråper alfa-naphtol og 4 dråper 40% KOH (kali-lut) tilsatt i det andre røret, blandet godt og avlest etter 10 minutter. En positiv reaksjon gir en rød farge øverst i mediet, en negativ reaksjon gir ingen farge(11).

Motilitetstest ved hjelp av Tryptone Soya Broth (TSB)

Testen undersøker bakterienes motilitetsevne ved bruk av «Hanging drop method». Bakteriekolonier ble inokulert i Trypton soya medium og inkubert i inkubasjons-shaker ved 15 °C ved en hastighet på 170 rpm. Grunnet manglende bakterievekst etter 8 dager, ble det forsøkt å inkubere rørene i en inkubator uten shaker ved 15 °C. Ingen bakterievekst etter 22 dager og testen ble avsluttet uten resultat.

Indol

Formålet med testen er å undersøke om bakterien produserer enzymer som kan hydrolysere aminosyren tryptofan til indol. Bakteriekulturene ble inokulert i medium tilsatt tryptofan og

inkubert i en shaker ved 15 °C og en hastighet på 170 rpm. Kun prøve nummer 8 hadde bakterievekst etter åtte dager. Ny inokulering med en større mengde bakterier ble utført for de 7 andre prøvene som ble inkubert i 12 dager før avlesning. For avlesning ble 100 mikroliter Ehrlichs reagens i 1 mL medium og videre undersøkt for fargeomslag. Testen er positiv dersom det dannes en rød ring øverst i mediet og negativ dersom det dannes en gul ring (11).

Triple sugar iron (TSI)

Formålet med testen er å undersøke om bakterien forgjærer laktose, sakkarose og glukose. Mediet inneholder glukose, sukrose, glukose, jernioner og en pH indikator. Dersom bakterien kun spalter glukose vil denne raskt brukes opp og bakterien går over til å spalte pepton som fører til en pH stigning. Mediet vil bli rødt på toppen grunnet pepton nedbryting og gult i bunnen. Dersom bakterien kan spalte laktose og/eller sukrose i tillegg til glukose blir hele mediet gult som følge av redusert pH. Mediet vil forbli rødt hvis bakterien ikke spalter sukrose, laktose eller glukose. Bakteriekolonier ble podet ut på skrålatten og sentralt i agaren, til bunnen av røret. Rørene ble inkubert i en shaker ved 15 °C i en hastighet på 170 rpm. På grunn av manglende vekst etter 8 dager ble rørene flyttet til en inkubator uten shaker ved 15 °C. Etter 22 dager ble resultatene avlest.

Aminosyre decarboxylase test

Formålet med testen er å undersøke om bakteriene har evnen til å dekarboksyilere ulike aminosyrer (produksjon av dekarboksyleringsenzymmer). Rørene inneholdt aminosyrene lysin, arginin og ornithin, samt et rør uten aminosyrer for negativ kontroll. Fargeforandring fra lilla til gul innen 24 timer og tilbake til lilla innen de neste 24 timene anses som en positiv test. Bakteriekolonier ble inokulert i rør med ulike aminosyrer og inkubert i en shaker ved 15 °C i en hastighet på 170 rpm.

Kanamycin

Formålet med denne testen er å undersøke om bakteriene er resistente eller sensitive for det antimikrobielle stoffet kanamycin. Bakteriene ble sådd ut på marin agar tilsatt kanamycin, og inkubert ved 15 °C i 5-6 dager, før resultatet ble lest av. Dersom bakterien vokser i petriskålen tilsatt kanamycin betyr det at den er resistent. Dersom det ikke er vekst er den sensitiv.

Antibiotikaresistenstesting ved hjelp av agar diffusjonsmetode

Formålet med testen er å undersøke om bakterien er sensitiv eller resistent for 6 ulike antibiotika. De 6 ulike antibiotikatyperne det testes for er Penicillin 10 mikrogram, Tetracyclin 30 mikrogram, Gentamicin 10 mikrogram, Erythromycin 15 mikrogram, Ceftazidime 30 mikrogram og Ampicillin 10 mikrogram. Alle bakteriene ble podet ut på to nye Mueller Hinton agarskåler med 2 % NaCl. Deretter ble en tablett fra hver av antibiotikatyperne plassert på skålen og videre inkubert ved 15 °C i 2 uker før avlesning.

Analytical Profile Index (API) 20E strip test

Et standardisert kit, API 20 E, benyttes som et identifiseringssystem for Gram-negative stavbakterier. Strip-systemet inneholder 21 biokjemiske tester. I hvert kit følger det med en underdel og et lokk. Brønnene i underdelen ble fylt med destillert vann for å skape et fuktig miljø for bakterievekst. De åtte bakteriekulturene ble blandet ut i 5 ml NaCl 0,85 % og inokulert videre i et API kit. Et kit til hver bakteriekultur, totalt 8 kit. De 20 tubene i hvert kit ble fylt med fortynnet bakteriekultur og for trinatriumcitrat (CIT), natriumpyruvat (VP) og gelatin (GEL) ble i tillegg kuppelen fylt. Det er viktig å unngå luftbobler siden det vil tilføre oksygen til inkuberingsprosessen. Dette er spesielt viktig hos de prøvene som skal inkuberes under anaerobe forhold. Videre ble mineralolje tilført i kuppelen for anaerob inkubering for

aminosyrene L-arginin (ADH), L-lysin (LDC), L-ornitin (OCD), gassen hydrogen sulfid (H₂S) og amidet urea (URE). Prøvene ble inkubert i 15 °C. For verifisering av reaksjon kreves minimum tre positive resultat for avlesing, D-glukose skal være en av de positive (12).

Molekylære metoder

DNA ekstraksjon

DNA ekstraksjon er prosessen der DNA isoleres fra annet cellulært materiale. Ekstrahert DNA kan brukes i prosesser som eksempelvis PCR. Det er ulike metoder å ekstrahere DNA og noen er mer omfattende enn andre. Felles for metodene er at de består av tre steg: Isolering av DNA, eliminering av cellulært debris og utfelling av DNA. Det ble benyttet to ulike metoder:

- **Varme-ekstraksjon:** Bakteriekolonier fra prøvene ble fortynnet i 600 mikroliter NaCl i et eppendorfrør med lokk, varmet opp ved 95 °C i 10 minutter før sentrifugering ved 12 000 g i 10 minutter. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør og lagret for videre undersøkelser. I denne metoden utvinnes ikke bare genomisk DNA, men også plasmid, proteiner og andre cellulære komponenter.
- **DNeasy Blood and Tissue Kit:** Metoden er utviklet for hurtig isolasjon av total DNA. Bakteriekoloniene ble blandet med 200 mikroliter PBS og 20 mikroliter proteinase K. 200 mikroliter buffer AL ble tilsatt blandingen og prøvene inkubert ved 56 °C i 10 minutter under kontinuerlig bevegelse. Dette fører til cellelysis og frigivelse av DNA. Deretter ble 200 mikroliter etanol tilsatt og blandet i en vortexmaskin. Blandingen ble overført til et minispinnrør med et 2 ml samlerør og sentrifugert ved 8000 rpm, ett minutt. 500 mikroliter buffer AW1 ble tilsatt og sentrifugert i ett minutt ved 8000 rpm. Væsken som hadde gått gjennom membranen ble fjernet. Tilsvarende prosedyre ble gjort med bufferløsning AW2 som ble sentrifugert i 3 minutter ved 14 000 rpm. Under disse prosessene vil DNAet feste seg til

membranen mens proteiner, salter og andre cytoplasmiske komponenter passerer membranen og vaskes vekk fra prøven. Minispinn-røret ble overført til et 2 ml eppendorfrør og tilsatt 30 mikroliter RNAase-fritt vann før sentrifugering ved 8000 rpm i ett minutt. DNAet vil frigjøres fra membranen og samler seg på bunnen av eppendorfrøret. DNAet som er isolert kan brukes for videre analyse.

Måling av DNA konsentrasjon

Etter DNA ekstraksjon måles konsentrasjonen av DNA i prøven. Dette ble gjort ved hjelp av Epoch Microplate Spectrophotometer. Prinsippet bak spektrofotometri er å måle absorpsjonsgraden av elektromagnetiske stråler med en bestemt frekvens som sendes gjennom prøvene. Nukleinsyrene i DNA har en maksimal absorpsjon ved 260 nm mens proteiner har en maksimal absorpsjon ved 280 nm og polysakkarider ved 230 nm. Ved å sende elektromagnetiske stråler gjennom prøvene er det mulig å estimere DNA konsentrasjonen. Det er viktig at maskinen kalibreres med væsken som er brukt i prøvene, i dette tilfellet destillert vann.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode for amplifisering av spesifikke DNA sekvenser og kan brukes for å lage millioner av identiske kopier av et stykke med DNA. Enzymet DNA-polymerase syntetiserer polymerer av nukleotider, en prosess som repeteres flere ganger. Polymerasen som benyttes ved PCR heter taq DNA- polymerase, et varmestabilt enzym som beholder den katalytiske aktiviteten selv om temperaturen er opptil 98 °C. Før metoden kan settes i gang må prøven klargjøres. Det ekstraherte DNAet fra hver enkel bakterieprøve fungerer som templat. I prøvene med lav DNA-konsentrasjon tilsettes et større volum av prøvene slik at konsentrasjonen av DNA blir jevnere i samtlige prøver. I tillegg forberedes en blanding bestående av vann, primere og MasterMix. Primere består av 15-25 basepar som induserer syntese av DNA i PCR

reaksjonen. De er komplementære til sekvensen på tråden som skal oppformeres (templatet) og det ble benyttet «forward primer» til starten av området og «reverse primer» til slutten av området. Primerne som ble benyttet har blitt designet spesifikt til dette prosjektet. MasterMix består av nukleotider, Mg^{2+} , buffer og DNA polymerase. Blandingen bestående av vann, primere og MasterMix pipetteres forsiktig over i PCR-brønner sammen med templat og utgjør til sammen 25 mikroliter. Prøven settes inn i PCR maskinen for videre prosessering. Først varmes prøven opp til ca 94-98 °C, den høye temperaturen gjør at dobbeltrådene skiller lag. Temperaturen senkes deretter til ca 40-65 °C slik at primerne kan feste seg til det komplementære området på DNA. Temperaturen heves til 72 °C og Taq DNA-polymerase replikerer DNA fra 3'-OH enden av primeren og lager to identiske kopier fra den opprinnelige tråden. DNA-polymerase kopierer DNA kun i 5' til 3' retning. De kopierte DNA trådene fungerer som templat for nye DNA tråder som gir en eksponentiell økning(13).

PCR ble utført med hensyn på både 16S rRNA og spesifikke primere. 16S rRNA er en generell primer som viser at det er prokaryot ribosomalt RNA tilstede i prøvene. 16S rRNA er en av de mest brukte genetiske markørene siden det er et «housekeeping gen» som er tilstede i nesten alle bakterier. Housekeeping gener er gensekvenser som koder for grunnleggende funksjoner. Det ble i tillegg utført PCR med primere spesifikt rettet mot *Tenacibaculum maritimum* og *Tenacibaculum finnmarkense* som kan bekrefte den bestemte bakteriearten i prøven.

For *Tenacibaculum finnmarkense* ble følgende primere brukt:

- Tb_tuf F1 bestående av 18 basepar, og Tb_tuf R1 bestående av 20 basepar.
- Tb_rpoB F1 bestående av 20 basepar, og Tb_rpoB R1 bestående av 22 basepar.

For *Tenacibaculum maritimum* ble følgende primere brukt:

- Tenaci-CsIA-F bestående av 39 basepar.
- Tenaci-CsIA-R bestående av 42 basepar.

For den ukjente bakterien ble primer rettet mot *Vibrio splendidus* benyttet grunnet en mistanke etter biokjemiske metoder:

- VS-rpoA-F, bestående av 22 basepar.
- VS-rpoA-R, bestående av 23 basepar.

Etter oppkonsentrering av ønskelig DNA-sekvens kan produktet prosesseres videre ved hjelp av gelelektroforese.

Gelelektroforese

Prinsippet bak gelelektroforese er å separere DNA molekyler av ulik størrelse i en agarosegel. Agarose er et polysakkarid som muliggjør vandring av DNA gjennom et elektrisk felt basert på størrelse. Agarosegelen (1,5%) ble laget ved å blande agarosepulver og TAE buffer under omrøring og ved oppvarming til 100 °C (som gir en flytende klar væske). Gel Red Nucleic Acid Gel Stain ble tilsatt (fluoriserende stoff som binder DNA for visualisering under UV-lys). Gelen ble avkjølt ved romtemperatur i ca 45 minutter, prøvematerialet ble så tilsatt i de ulike brønnene.

Brønn 1 ble fylt med en 1 kb + DNA Ladder (mal for størrelsesangivelse). Brønn 2, negativ kontroll, og resterende brønner ble det fylt med prøvemateriale blandet med 5 µl DNA Gel Loading Dye. Gelelektroforesen ble kjørt på 90 volt i 45 minutter. Negativt ladede molekyler, som DNA, vil vandre mot den positive polen. Vandringshastigheten avhenger av størrelsen på molekylene og voltstyrken. Store molekyler vandrer langsommere gjennom gelen enn de små

molekylene. Deretter ble gelen undersøkt under UV lys, herunder negativ kontroll (negativ) og størrelsen på amplikon av positive/ukjente prøver.

Gelekstraksjon

Ekstrasjon av DNA fra agarosegelen benyttes før prøven sendes inn til sekvensering (benyttet protokoll for QIAquick Gel Extraction Kit). Gelen skjæres ut under UV lys og overføres til 2 ml eppendorftuber. Under gelekstraksjonen fjernes primere, nukleotider, enzymer, salter, agarose og andre kontaminanter fra DNA. Kun den isolerte, amplifiserte DNA-sekvensen står igjen. Prinsippet bak metoden er adsorbering av DNA til silica-membranen ved høye saltkonsentrasjoner, mens kontaminantene passerer. Gelbitene ble veid og deretter tilsatt buffer QG i forholdet 3:1. Tre deler buffer, en del gel. Blandingen ble inkubert ved 50 °C i 10 minutter under kontinuerlig bevegelse. Gelen skal etter denne behandlingen være fullstendig oppløst og ha en gul farge. 1 del isopropanol ble tilsatt, tilsvarende 1 del gel og blandet godt i en vortex. Isopropanol løser opp strukturen til DNA og gjør DNA tilgjengelig for prosessering. Væsken overføres til et QIAquick spin rør med en silica-membran som binder DNA. Røret sentrifugeres i ett minutt på 13 000 rpm. Væsken som har passert membranen fjernes. Deretter ble det tilsatt 500 mikroliter QG buffer og prøven ble sentrifugert i ett minutt ved samme hastighet og væsken som passerte membranen ble fjernet. Samme prosedyre ble utført med PE buffer og inkubering ved romtemperatur i 2 minutter før sentrifugering. Membrandelen av QIAquick spin rør ble flyttet over i et 2 ml eppendorfrør og tilsatt 20 mikroliter RNase-fritt vann. Dette ble sentrifugert i ett minutt på 13 000 rpm DNA er ekstrahert fra agarosegel og klar for sekvensering. DNA-konsentrasjonen ble målt før innsendelse til Eurofins genomics for sekvensering.

Materiale og metode – Del 2

For å kartlegge ulike risikofaktorer for tenacibaculose ble det gjennomført en spørreundersøkelse (vedlegg 2) hvor et spørreskjema med de samme spørsmålene ble sendt ut til ulike anlegg i Nord-Norge (n=5) som har eller tidligere har hatt utbrudd i løpet av de to siste årene. Det ble utført telefonintervju hos to anlegg. De fem deltagende anleggene er matfiskanlegg for atlantisk laks lokalisert i Troms og Nordland.

Resultater

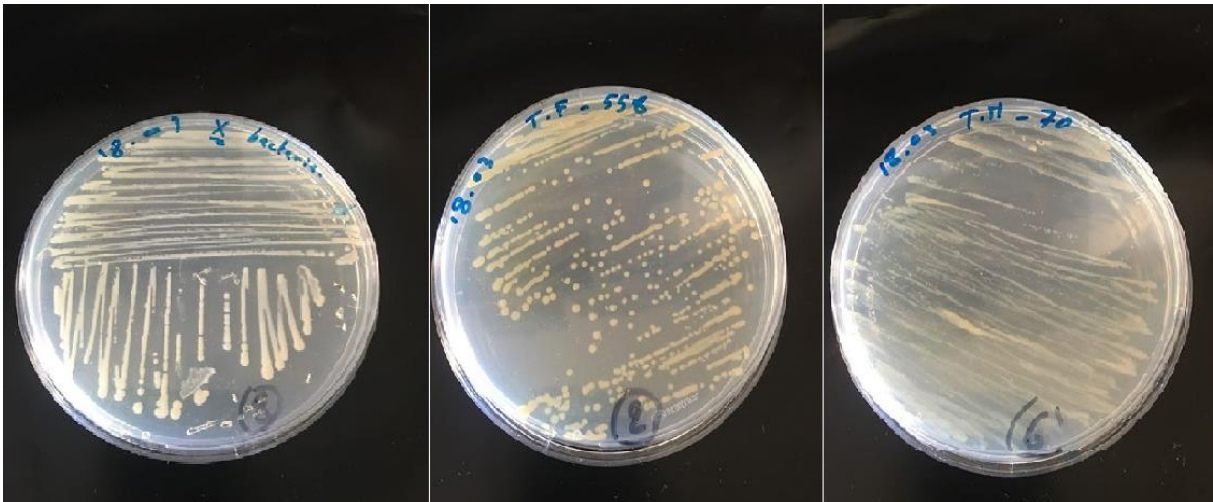
DEL 1

Bakteriemorfologi

Tabell 1.1. Oversikt over de åtte bakterienes morfologi etter 5 dager ved 15 ° på marin agar med 3 % NaCl

BAKTERIE MORFOLOGI						
	Form og størrelse koloni	Margin av koloni	Kromogenese og opasitet	Elevasjon koloni	Overflate koloni	Konsistens tekstur
1. TF	1 - 2 mm, sirkulære	Fullstendig margin	Opak, sennepsgul, hvitaktig perifert Middels transparent perifert	Lett hevet	Glatt, glinsende	Viskøs, slimete konsistens
2. TF	1 mm, sirkulære	Fullstendig margin	Opak, blek sennepsgul, hvitaktig perifert	Lett hevet	Glatt, glinsende	Viskøs, slimete konsistens
3. TF	Pin point, 0,2 -0,5 mm, irregulær, sirkulær form	Overlappinge kolonier	Opak, sennepsgul	Flate	Glatt, glinsende	Viskøs, slimete konsistens

BAKTERIE MORFOLOGI						
4. TF	2 mm	Fullstendig margin	Opak, sennepsgul,	Flate	Glatt	Viskøs, slimete konsistens
5. TF	1,5 - 2 mm	Fullstendig margin	Opak, oransje mot sennepsgul	Flate	Glatt, glinsende	Viskøs, slimete konsistens
6. TM	Pin point	Fullstendig margin	Opake, lys beige	Flate	Glatt, blank i overflaten	Klebrig konsistens
7. TM	Pin point	Fullstendig margin	Opake, lys beige	Flate	Glatt	Klebrig konsistens
8. Ukjent	Gj.snitt: 1,06 mm, sirkulære og irregulære	Fullstendig margin	Opak, kremfarget	Flate	Glatt og blank i overflaten	Myk, lav viskositet



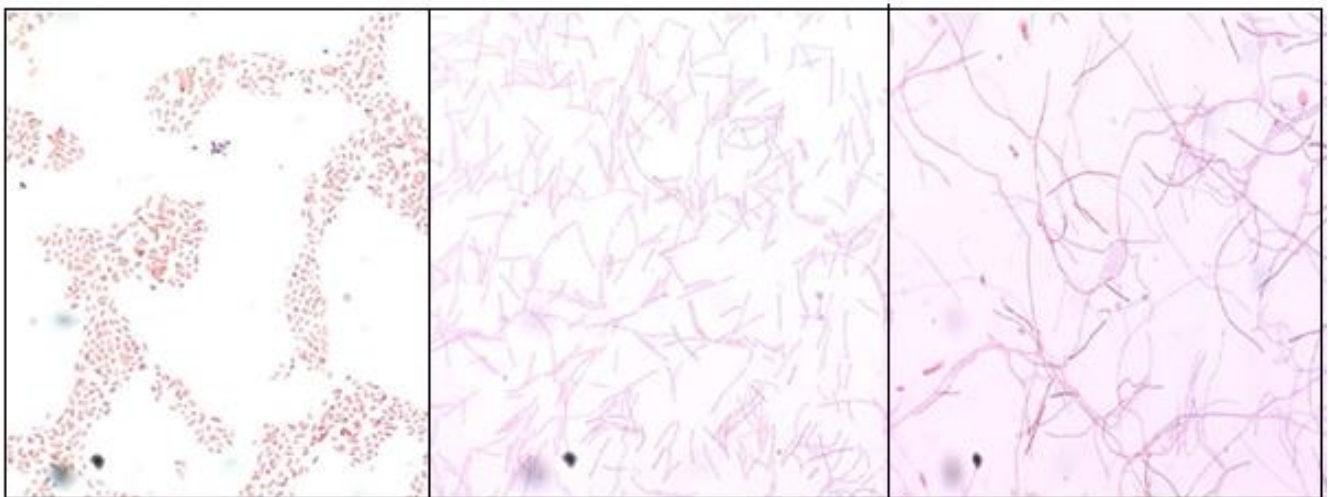
Figur 2: Bakteriemorfologi fra ukjent bakterie (8), *T. finnmarkense* (2), og *T. maritimum* (6).

Gramfarging

Tabell 1.2. Resultat etter gram farging.

GRAMFARGING		
	Form	Gram -/ Gram +
1. TF	Lange kjeder, stavformede bakterier	Negativ
2. TF	Lange kjeder, stavformede bakterier	Negativ
3. TF	Lange kjeder, stavformede bakterier	Negativ
4. TF	Lange, stavformede bakterier	Negativ
5. TF	Lange, stavformede bakterier	Negativ
6. TM	Stavformede bakterier, ligger i trådformede kjeder	Negativ
7. TM	Stavformede bakterier, ligger i trådformede kjeder	Negativ
8. Ukjent	Staver, ikke sammenhengende.	Negativ

T. finnmarkense har lengre kjeder av staver enn *T. maritimum*. *T. maritimum* er svært klebrig og henger ofte sammen, mens *T. finnmarkense* er mer slimete i konsistensen. Tentativ vurdering for ukjent bakterie er foreløpig *Vibrio* sp, da den er en gram negativ stav bakterie og har annerledes konsistens enn *Tenacibaculum* spp.

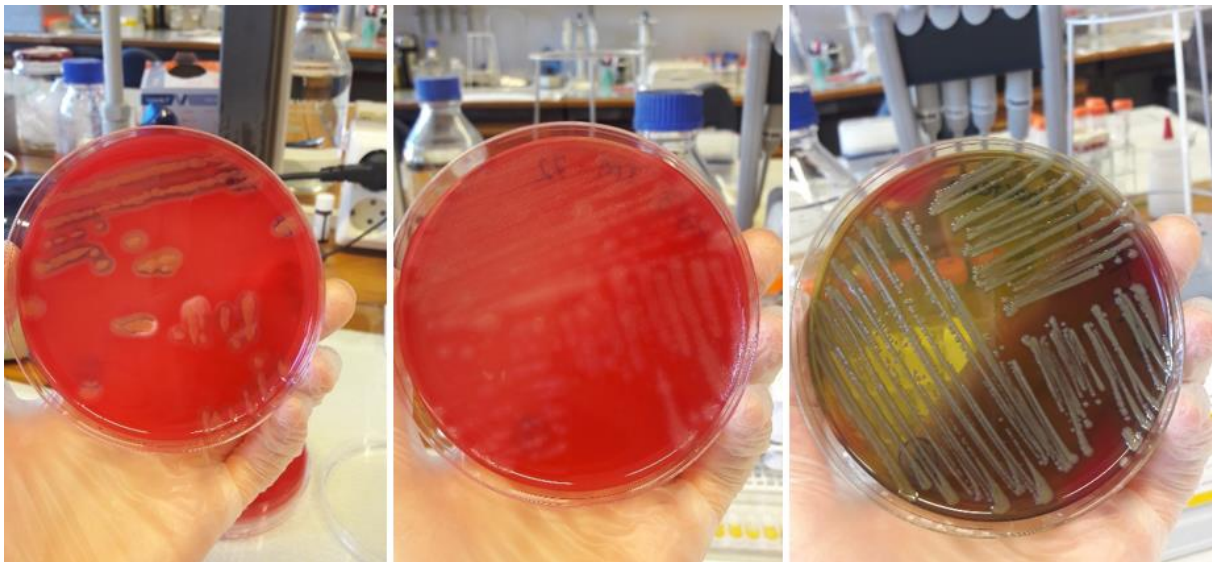
Figur 3: Gramfarging. Fra venstre: ukjent bakterie (8), *T. maritimum* (6) og *T. finnmarkense* (1).

Hemolyse

Tabell 1.3. Resultater etter utsæd på blodskål.

BLODSKÅL OG HEMOLYSE								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Vokser på blodskål	Positiv	Positiv	Positiv, svak	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
Hemolyse	Positiv, betahe- molyse	Positiv, betahe- molyse	Positiv, betahe- molyse	Positiv, betahe- molyse	Negativ	Positiv, betahe- molyse	Positiv, betahe- molyse	Positiv, alfahe- molyse

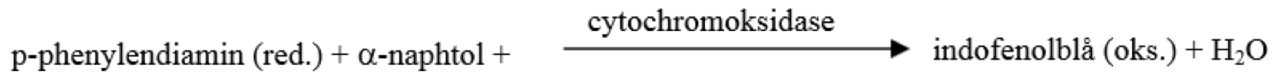
T. maritimum vokste saktere enn de andre bakteriene og hadde en svakere hemolyse.



Figur 4: Vekst på blodskål. Fra venstre: *T. finnmarkense* (1), *T. maritimum* (7) og ukjent bakterie (8).

Oksydase

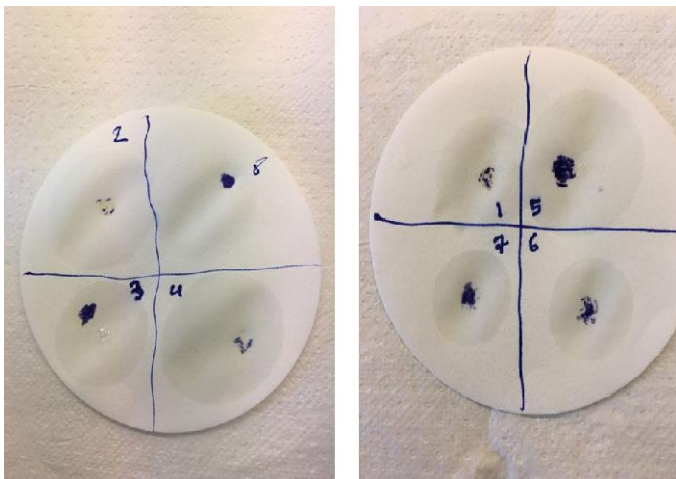
Enzymet cytokrom c oksydase katalyserer overføringen av elektroner til oksygen i den aerobe respirasjonsskjeden. Når enzymet er tilstede vil det redusere N,N-dimethyl-p-fenyldiamin, som fungerer som en kunstig elektronakseptor, til indofenolblå.



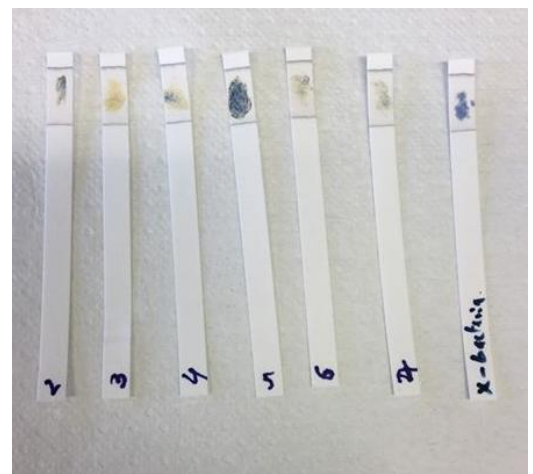
Tabell 1.4. Resultat etter oksydase test.

OKSYDASE								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Oksydase	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv

Samtlige bakterier produserte enzymet cytokrom c oksydase. Resultatene fra stripser var vanskeligere å tolke enn resultatet fra filterpapiret. For å unngå tolkningsfeil ble begge testene utført og avlest.



Figur 5 Resultat etter oksydasetest på filterpapir



Figur 6 Resultat etter oksydasetest på strips

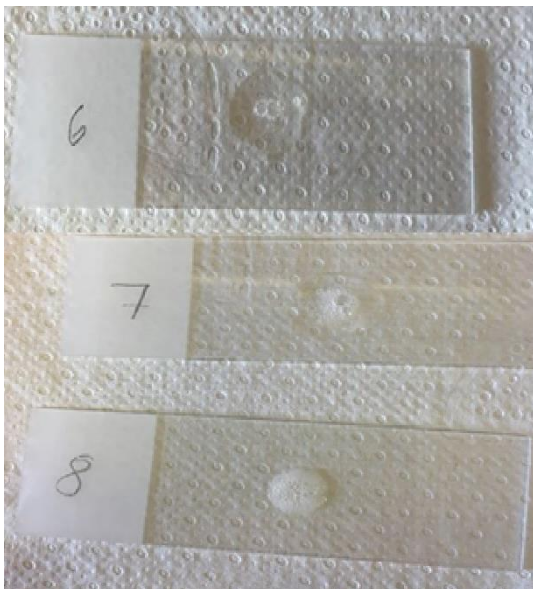
Katalase

Katalase katalyserer frigjøringen av oksygen fra hydrogenperoksid som er et endeproduktene i den aerobe metabolismen. Ved aerob vekst spaltes hydrogenperoksid av katalase med dannelse av vann og oksygen.

Tabell: 1.5. Resultat etter vurdering av katalase produksjon.

KATALASE								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Katalase	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv

Tenacibaculum finnmarkense produserer ikke enzymet katalase. *Tenacibaculum maritimum* og ukjent bakterie produserer enzymet katalase som spaltes hydrogenperoksid til vann og oksygen ved aerob metabolisme.



Figur 7: Positive katalasetester fra *T. finnmarkense* (6), *T. maritimum* (7) og ukjent bakterie (8). Bakteriene 1-5 var negative.

Hugh og Leifson

Mediet er tilsatt en pH- indikator. Ved spalting av sukkerarten, vil pH synke og mediet skifter farge. Parafinolje tilsatt på toppen av mediet benyttes for å undersøke evne til anaerob fermentering.

Resultat:

- Rørene med parafinlokk: ingen vekst.
- Rørene uten parafinlokk: Rør nummer 1 og rør nummer 8 var positive. Rør nummer 2, 3 og 4 er svakt positiv. Rør nummer 5, 6 og 7 var negativ. Negativ kontroll var negativ.

Methyl Red-Voges Proskauer (MRVP)

Metylørødt-testen baserer seg på syrene som produseres ved fermentering av glukose. Voges-Proskauer testen baseres på glukose som metaboliseres til pyruvatsyre og videre til aceton. Enzymene som katalyserer reaksjonene kan detekteres indirekte ved å påvise sluttproduktet aceton.

Tabell 1.6: Resultatet fra methyl red og voges proskauer

METHYL RED- VOGES PROSKAUER								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Methyl red	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ.	Negativ	Negativ	Negativ
Voges Proskauer	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

I rør nummer 5 var det liten bakterievekst. I rør nummer 6 og 7 var det svært liten bakterievekst.

Negativ kontroll var negativ.

Motilitetstest ved hjelp av Tryptic Soya Broth (TSB)

Resultat: Ingen bakterievekst og testen ble avsluttet uten resultat.

Indol

Aminosyren tryptofan spaltes av flere enzymer og det dannes blant annet indol. Indol kan påvises ved å tilsette para-dimethylamino-benzaldehyd (Kovacs reagent) som binder seg til indol og danner et rødfarget produkt.

Tabell 1.7 Resultat etter indoltest.

INDOL								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Indol	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv

I rør nummer 5,6, og 7 var det svært liten bakterievekst. I rør nummer 8 var resultatet for den første testen negativ, mens på den andre testen ble resultatet positivt.

Triple sugar iron (TSI)

Tabell 1.8. Resultat etter TSI test.

TSI								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Forgjæring av sukker.	Negativ	Svak positiv	Svak positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv. Hele mediet er gult.

Negativ kontroll var negativ.

Aminosyre decarboxylase test

På grunn av manglende bakterievekst ble testen avsluttet uten resultat.

Kanamycin

Kanamycin er et aminoglykosid som fester seg til 30S subenheten på ribosomene og hemmer proteinsyntese. Antibiotikumet finnes blant annet i preparatet Kanaplex og brukes for å behandle bakterie- og soppinfeksjoner hos fisk (14).

Tabell 1.9. Resultat etter resistenstesting med Kanamycin.

KANAMYCIN								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
Kanamycin	Resistent (svakere)	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent

Antibiotikaresistenstesting ved hjelp av agar diffusjonsmetode:

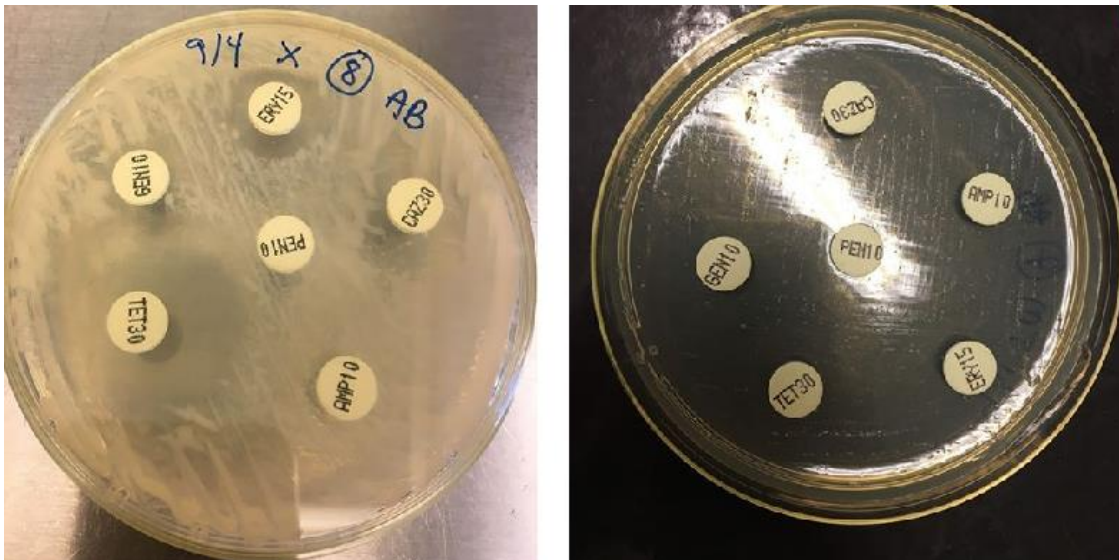
Ved å se på diameteren på vekstsonen kan det avgjøres om bakterien er følsom, intermediær, eller resistent.

Tabell 2.0 Resultat etter agar diffusjonsmetode.

	Penicillin	Tetracyclin	Gentamicin	Erythromycin	Cefrazidime	Ampicillin
1. TF	Resistent	Resistent	Resistens	Resistent	Resistent	Resistent
2. TF	Resistent	Resistens	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
3. TF	Resistent	Resistens	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent

4. TF	Resistent	Resistens	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
5. TF	Resistent	Resistens	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
6. TM	Resistent	Resistens	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
7. TM	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent	Resistent
8. Ukjent	Resistent	Svært sensitiv. Hemningssone: 3,1 cm i diameter.	Intermediær. Hemningssone: 1,05 cm i diameter.	Sensitiv. Hemningssone: 1,8 cm i diameter.	Intermediær. Hemningssone: 1,7 cm i diameter.	Resistent

Det var svak vekst i samtlige av skålene 1-7, men veksten var tilstrekkelig for å vurdere at bakteriene var resistente.



Figur 8: Antibiotikaresistenstesting. Tydelige hemningssoner på ukjent bakterie (8) til venstre. *Tenacibaculum maritimum* til høyre.

API test

API 20 E strip består av 20 mikrotuber som inneholder dehydrert substrat. Testene ble inokulert med en bakteriell suspensjon som rekonstituerer mediet. Under inkubering vil metabolisering kunne gi et positivt eller negativt resultat i form av et fargeomslag, enten spontant eller avdekket ved tilsetning av reagens. Med de ulike testene vurderes bakteriens evne til enten å produsere det aktive stoffet for en reaksjon eller produsere enzymet som katalyserer reaksjonen. Det ble

først avlest resultat med hensyn på eventuell fargeendring etter tabell, vedlegg 1. For noen stoffer må reagens tilsettes for avlesing, dette gjelder L-tryptofan (TDA), Indol (IND) og natriumpyruvat (VP). Disse tre testene må leses av tilslutt da reagensen kan ødelegge resultatet for de andre testene. Det ble tilsatt 1 dråpe TDA-reagens til TDA-kuppel. Videre 1 dråpe VP 1-reagens og en dråpe VP 2-reagens til VP kuppel for reaksjon. VP-reaksjonen vurderes 10 minutter etter tilsetting. Deretter ble 1 dråpe Indol-reagens tilsatt i IND for reaksjon og avlesing. En dråpe nitrat ble tilsatt D-glukose (GLU) for vurdering om bakterien reduserer nitrat til nitritt. I tillegg ble zinc pulver tilført for vurdering om bakterien produserer nitrogen(12).

Forklaring til tabell(15):

1. ONPG - test for tilstedeværelse av enzymet beta-galaktosidase ved hydrolyse av substrat o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside (ONPG).
2. ADH - test for tilstedeværelse av enzymet arginine dihydrolase for dekarboksylering av aminosyren arginin.
3. LCD - tilstedeværelsen av enzymet lysin-dekarboksylase for dekarboksylering av aminosyren lysin
4. OCD - tilstedeværelsen av enzymet ornitin dekarboksylase for dekarboksylering av aminosyren ornitin
5. CIT - testen vurderer bakteriens evne til å utnytte citrat som en kilde til karbon
6. H₂S - detekterer bakteriens evne til å produsere hydrogensulfid
7. URE - detekterer tilstedeværelsen av enzymet urease i bakterien
8. TDA - detekterer tilstedeværelsen av enzymet tryptofan deaminase
9. IND - detekterer produksjon av indol fra tryptofan ved tilstedeværelsen av enzymet tryptofanase

10. VP - Voges-Proskauer-test for detektering av acetyl metylkarbinol som produseres ved fermentering av glukose der bakterien utnytter butylen glykol reaksjon
11. GEL - detekterer produksjon av enzymet gelatinase som omdanner gelatin til væskeform.
12. GLU - tester bakteriens evne til å fermentere glukose
13. MAN - tester bakteriens evne til å fermentere mannose
14. INO - tester bakteriens evne til å fermentere inositol
15. SOR - tester bakteriens evne til å fermentere sorbitol
16. RHA - tester bakteriens evne til å fermentere rhamnose
17. SAC - tester bakteriens evne til å fermentere sukrose
18. MEL - tester bakteriens evne til å fermentere melibiose
19. AMY - tester bakteriens evne til å fermentere amygdalin
20. ARA - tester bakteriens evne til å fermentere arabinose

Tabell 2.1. Resultat etter API test.

API - kit 20E								
	1. TF	2. TF	3. TF	4. TF	5. TF	6. TM	7. TM	8. Ukjent
ONPG	Positiv			Positiv				Positiv
ADH	Negativ			Negativ				Positiv
LDC	Negativ			Negativ				Negativ
ODC	Negativ			Negativ				Negativ
CIT	Negativ			Negativ				Positiv
H₂S	Negativ			Negativ				Negativ
URE	Negativ			Negativ				Negativ
TDA	Ikke avlesbar			Positiv				Positiv
IND	Negativ			Negativ				Positiv
VP	Negativ			Negativ				Positiv

API - kit 20E								
GEL	Positiv			Positiv				Positiv
GLU	Negativ			Negativ				Positiv
MAN	Negativ			Positiv				Positiv
INO	Negativ			Negativ				Negativ
SOR	Negativ			Negativ				Negativ
RHA	Negativ			Negativ				Negativ
SAC	Partiell negativ			Positiv				Positiv
MEL	Positiv			Negativ				Partiell negativ
AMY	Negativ			Partiell negativ				Positiv
ARA	Negativ			Negativ				Negativ
NO2	Negativ			Positiv				Positiv
N2	Negativ			Positiv				Positiv

I ukjent prøve nummer 8 var det mer enn 3 positive resultater etter 1 ukes inkubering og testen var dermed klar for avlesing. For *Tenacibaculum finnmarkense* og *Tenacibaculum maritimum* var det kun en til to positive resultater per kit, og disse ble derfor inkubert videre på 15°C. Prøve nummer 4 var klar for avlesning etter 2 uker, mens prøve nummer 1 ble avlest etter 3 uker og 5 dager. De resterende prøvene fikk aldri 3 positive resultater på grunn av manglende vekst og de ble dermed ikke avlest.



Figur 9: Resultat API test fra *Tenacibaculum finnmarkense* (4).



Figur 10: Resultat API test fra ukjent bakterie (8).

DNA konsentrasjon

Tabell: 2.2. Resultat etter spektrofotometri av prøvene.

DNA konsentrasjon 1	
	DNA-konsentrasjon ng/uL
1. TF	155,172
2. TF	167,342
3. TF	63,091
4. TF	137,768
5. TF	154,057
6. TM	34,081
7. TM	30,524
8. ukjent	56,516

DNA konsentrasjon 2	
	DNA-konsentrasjon ng/uL
1. TF	229,867
2. TF	109,838
3. TF	54,311
4. TF	98,873
5. TF	55,163
6. TM	273,458
7. TM	465,41
8. ukjent	165,82

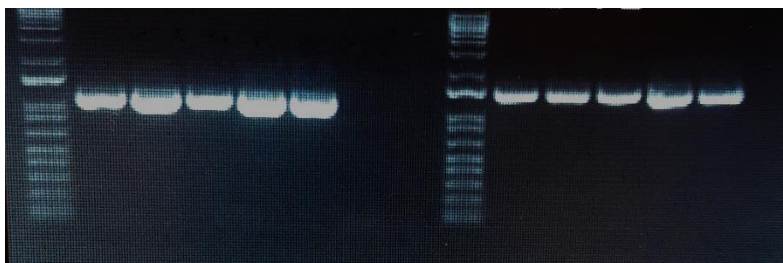
PCR

16S: PCR bekrefter at det er ribosomalt RNA tilhørende bakterier i familien *Flavobacteriaceae*.

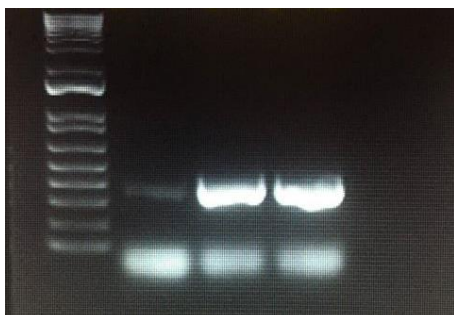


Figur 11: PCR kjørt med primer 16S på alle bakterieprøvene.

Tuf, rpoB og tenaci-CsIA: PCR med spesifikke primere bekrefter tilstedeværelse av *Tenacibaculum finnmarkense* og *Tenacibaculum maritimum*.

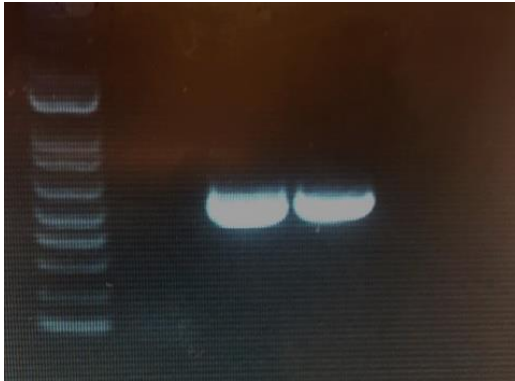


Figur 12: PCR *Tenacibaculum finnmarkense* kjørt med primere tuf(t.v) og rpoB(t.h).



Figur 13: PCR *Tenacibaculum maritimum* kjørt med primer tenaci-CsIA.

VS-rpoA: Ukjent bakterie bekreftes til *Vibrio splendidus* via PCR og spesifikke primere rettet mot denne bakteriearten.



Figur 14: PCR *Vibrio splendidus*

Sekvensering

Sekvenseringsresultatene mottatt fra Eurofins genomics ble bekreftet ved hjelp av National Center for Biotechnology Information (NCBI).

16S RNA sekvenser

Nummer 1: Ikke mottatt resultater fra denne.

Nummer 2:

```
AACGGCGTAGCAAGCTTCACGTGCAGTACCAGTCGTCGATTGTGCTTGCGCTGCT
GACGACCGGCGAACGGGTGCGTAACGCGTATAGAATCTGCCTTGTACAGGAGGA
TAGCCTTTAGAAATGAAGATTAACACTCCATAATGTAATAGTCTGGCATCACTTT
ATTATTAACATTTATGGGTACAAGATGACTATGCGTCCCATTAGCTAGATGGTG
AGGTAACGGCTTACCATGGCAACGATAGGTAGGGGGTCTGAGAGGATTATCCCC
CACACTGGTACTGAGACACGGATCAGACTCTTAAAA.
```

Bekreftet *Tenacibaculum finnmarkense* strain Tsp.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. med 98.80% identitet.

Nummer 3:

GAGCTCCACGATATCTTTCAGTGCCACTACCAGTCGTCGAGTGGGCTTGCTTGCCT
TCGATGGCCTCGGGTGCGTATAGCGTTCTTGTCTGATTTGTGTTTAATTATAAACT
TTTGAAATGAAGATTACCACTCCAAGTGGTAATAGACTGGCATCACTTTTTTTATTA
AACATTTATGGGTACTAGATAACCATGCGTCCCATTAGCGAGATGGTGAGGTAAT
GGCTTACCATGGCGACGATAGGTAGGGGGTCTGAGAGGATTATCCCCCACGTTGG
TCCTGAGCCAGGATCAAAAAAAAAACAAAA

Bekreftet *Tenacibaculum finnmarkense* strain S2F3 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence. Bekreftet med 91.01% identitet (162/178).

Nummer 4:

GACGACGGCGCAGCTTCACGTGCAGTCGAGTCGTCCATTGTGCTTGCGCTGCTGA
CGACTGGCGAACGGGTGCGTAAACGCGTATAGAATCTGCCTTGTACAGGAGGATA
GCCTTTAGAAATGAAGATTACCACTCCATAATGTAATCGTCTGGCATCAATTCTCT
ATTAAACATTTATGGGTACAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTGAGG
TAACGGCTTACCATGGCGACGATAGGTAGGGGGTCTGAGAGGATTATCCCCACA
CTGGTACTGAGCCAGGATCAAAATCTCAAAA

Bekreftet *Tenacibaculum finnmarkense* strain Tsp.2 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence. Bekreftet med 95.44% identitet (230/241).

Nummer 5:

GACGACGTCGCTGCTTAACGTGCAGTCGTGTCGTCGATTGTGCTGGCGCTGCTGA
CGACTGGCGAACGGGTGCGCACGCGTTAGAATCTGCCTTGTCAGGAGGATAGCCT
TTAGAATGAAGATTAACACTCCATAATGTAATGATTTCGGCATCAAAACACTATTA
AACATTTATGGGTACAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGGTAAGGTAAC
GGCTTACCATGGCTACGATAGGTAGGGGGTCTGAGAGGATTATCCCCCACTGG
TACTGAGACAGGACCAGACTCACAAAGG

Bekreftet *Tenacibaculum finnmarkense* strain Tsp.5 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence med 95.98% identitet (239/249).

Nummer 6:

GTCGAAACGGCAGCCTTCACATGACAGTTCGAGGGGTACATTGTAGCTTGCTACA
GATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAACAATCTGCCTTCTACAGAGG
GATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTT
TTAAAGTTAAAGATTTATCGGTAGAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGG
TAAGGTAACGGCTTACCATGGCAACGATAGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCC
CCCACACTGGTACTGAGCCAGGATCA

Bekreftet *Tenacibaculum maritimum* strain NLF-15 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence med 98.76% identitet (238/241).

Nummer 7:

GTCGAAACGGCAGCCTTCACATGACAGTTCGAGGGGTACATTGTAGCTTGCTACA
GATGACGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAACAATCTGCCTTCTACAGAGG
GATAGCCTTTAGAAATGAAGATTAATACCTCATAACACTTTGGAATGGCATCGTT

TTAAAGTTAAAGATTTATCGGTAGAAGATGACTATGCGTCCTATTAGCTAGATGG
TAAGGTAACGGCTTACCATGGCAACGATAGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCC
CCCACACTGGTACTGAGCCAGGATCA

Bekreftet *Tenacibaculum maritimum* strain NLF-15 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence med 98.76% identitet (238/241).

Nummer 8:

GTCCATTCGGCGGCTACCGTGCAGTCGAGCGGTAACGACACTATTAGTCCTTCGG
AGGATTTAGTGGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCC
TTGATGTGGGGGATAACCATTGTAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGG
GCCACAGAGGGGGATCTTCGGACCTCTCGCGTCCCGATATGCCTAGGTGGGATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGAAGTACACAAGGTCCAAACTAATAC

Bekreftet *Vibrio sp.* MOLA 527 partial 16S rRNA gene med 95.53% identitet.

Sekvenser av "husholderingsgener" (delvis sekvens)

Nummer 6:

GATGGGCTGTGCTCAGTAGCTCCATCTCCATATACAGGAAATACTAGTGTACAAA
GAGCTAATATACCTTTAAAGTTGAAGAAAGATATGCAAGTTTATTTAGAAAAAGA
TACCGATATACTGGTGCTTTCTTCAATAAACCATCTCAAAAAAGTCGAGATTATA
GGAATAAATGGGAGAGTAGCTGCATCTTATGATAGGCTAAATGTATATGATATGA
ATATTGATATGTCTAACTATCCAAAAGGAGTGTATATTGTAAGGATATTGGATGA
AAAGAACCAGTTAATAACAGAGAAAGTTCTTAAAATATAAGAATTCAAAAAAA

Bekreftet *Tenacibaculum maritimum* isolate med 95.68% identitet.

Nummer 7:

GATCGGCTGTGCGCGGTAGCTCCTCTCCATATACAGGAAATACTAGTGTACAAAG
AGCTAATATACCTTTAAAGTTGAAGAAAGATATGCAAGTTTATTTAGAAAAGAT
ACCGATATACTGGTGCTTTCTTCAATAAACCATCTCAAAAAAGTCGAGATTATAG
GAATAAATGGGAGAGTAGCTGCATCTTATGATAGGCTAAATGTATATGATATGAA
TATTGATATGTCTAACTATCCAAAAGGAGTGTATATTGTAAGGATATTGGATGAA
AAGAACCAGTTAATAACAGAGAAAGTTCTTAAAATATAAGAATTCA

Bekreftet *Tenacibaculum maritimum* isolate med 95.33% identitet.

Nummer 8:

GACGATGCAGTCTAGGTATGCTCTTCGCCGCATTCTTCTATCTTCTATGCCGGGTT
GTGCCGTAACAGAAGTTGAAATTGAAGGTGTGCTACACGAATACAGCACTAAAG
AAGGCGTTCAGGAAGATATCCTGGAAATCCTTCTAAACCTTAAAGGTTTAGCTGT
ACGCGTTGCTGAAGGCAAAGATGAAGTGTTTATTACACTGAACAAATCAGGCTCA
GGCCCTGTTGTTGCAGGTGACATCACCCACGATGGTGATGTAGAGATCGCTAACC
CTGAGCACGTAATTTGTCACCTAACGGATGACAATGCTGAGATCGCTATGCGTAT
CAAAGTAGAACGTGGTCGTGGTTACGTTCCAGCTTCAGCTCGTATCCATACTGAA
GAAGATGAGCGTCCTATCGGTCGTCTATTAGTTGACGCTACTTACAGCCCGGTTG
ATAAAATCGCCTATGCTGTAGAAGCGGCACGTGTAGAACAACGTACTIONGATTAGAA
CAAGCTTGTTATCGATATGGAAACGAGCT

Bekreftet *Vibrio splendidus* strain BST398 chromosome 1, complete sequence med 99.80% identitet (511/512).

DEL 2

Ingen av anleggene hadde aktive utbrudd av *Tenacibaculum* spp. da spørreundersøkelse ble utført i februar-mars 2019. Det ble derfor benyttet tall fra tidligere utbrudd i 2018 og 2019.

Varighet og antall affiserte merder

Utbruddene varte mellom to og fire uker og ett anlegg hadde fremdeles klinisk syk fisk ut over fire uker. Fire av fem anlegg hadde utbrudd i samtlige merder. Et anlegg hadde utbrudd i tre av åtte merder, der de tre merdene som hadde syk fisk var lokalisert ut mot åpent hav og var derfor mer eksponert enn andre merder. De tre merdene med utbrudd var i tillegg mindre enheter på 90-meters ringer, mens de fem uten utbrudd var 130-meters ringer. Utbruddene skjedde i vinterhalvåret og gjennomgående for samtlige merder i undersøkelsen var utsett på fallende vanntemperatur.

Sjøsetting og smoltkvalitet

Fire av fem anlegg opplevde utbrudd 2 - 3 uker etter sjøsetting. Et anlegg skilte seg ut med utbrudd 4 - 5 måneder etter sjøsetting. Dette anlegget hadde sjø satt 0-åring i oktober og utbruddet begynte i februar/mars. Videre hadde anlegget utsett av smolt på 60 - 80 gram. Dette er noe mindre enn de andre anleggene i undersøkelsen, men stadig innenfor normal smoltstørrelse ved sjøsetting og smoltkvaliteten var vurdert til normal. De resterende fire anleggene vurderte også smoltkvaliteten til å være normal. Størrelsen på smoltet hos disse anleggene var mellom 80 - 180 gram der et anlegg hadde stor variasjon på sitt utsett, henholdsvis mellom 100 - 180 gram ved sjøsetting. Dette anlegget måtte sette ut smolten tidligere enn planlagt grunnet tekniske problemer på settefiskanlegget.

Årstid for utbrudd og vanntemperatur

Vanntemperaturen hos anlegg i utbruddsfasen var gjennomgående under 7 °C. Tre av fem anlegg opplevde utbrudd i slutten av desember og i løpet av januar måned, mens de to resterende anleggene hadde problemer i mars 2018. Disse to anleggene er lokalisert i Troms og historisk sett så var det svært kalde vanntemperaturer i Troms i mars og april 2018. Vanntemperaturen er sjelden under 4 °C på disse anleggene, men i mars 2018 opplevde begge anlegg vanntemperaturer på 4 °C og kaldere.

Mekanisk avlusing og rensefisk

Et anlegg benyttet mekanisk avlusning i form av Thermolicer, to ganger før utbrudd. Dette gjaldt for utsettet som hadde utbrudd 4-5 måneder etter sjøsetting. De resterende fire anleggene hadde ikke lus på anlegget siden utbruddene skjedde 2-3 uker etter sjøsetting. Kun et anlegg hadde rensefisk i merdene under utbrudd, herunder 10 % rensefisk og utbruddet skjedde 2-3 uker etter sjøsetting.

Tabell 2.2. Systematisering av relevant informasjon fra anleggene.

	Sjøsetting	Utbrudd	Vanntemperatur	Smoltstørrelse	Avlusing
Anlegg 1	Tidlig i desember 2018	Sent i desember, 2-3 uker etter sjøsetting	Sjøsatt på fallende temperatur	110 - 130 gram.	10 % rensefisk
Anlegg 2	Oktober 2017	Februar-mars 2018, 4-5 måneder etter sjøsetting	Sjøsatt på fallende temperatur	60-80 gram, normal smolt	2 x Thermolicer
Anlegg 3	Sent i desember 2018	Januar 2019, 3 uker etter sjøsetting	3,3 °C. Sjøsatt på fallende temperatur	80 gram på de som ble syke, stor variasjon i størrelse	

Anlegg 4	Januar 2019	Sent i januar 2019, 2 uker etter sjøsetting	Ca 4 °C. Sjøsett på fallende temperatur	100 gram	
Anlegg 5	Tidlig mars 2018	Sent i mars 2019, 2-3 uker etter sjøsetting	Rundt 4 °C. Sjøsett på fallende temperatur.	100-180 gram, stor variasjon i størrelse grunnet teknisk feil på settefiskanlegget.	

Salinitet og oksygennivå

Salinitet og oksygennivå i merdene er valgt bort fra undersøkelsen da få anlegg har konkrete tall på dette. Anleggene opplyste om stabile verdier og ingen spesielle utfordringer med hensyn på oksygen. Hos de to anleggene med konkrete oksygenmålinger var verdiene 8,62 mg/L og 9,11 mg/L under utbrudd. Videre målte tre anlegg salinitet som under utbrudd var 32‰, 32,7‰ og 32,5 ‰. Ingen spesielle utfordringer knyttet til saliniteten.

Håndtering, skadedyr og fôring

Det hadde ikke blitt utført noen annen form for håndtering enn transport fra settefiskanlegg til matfiskanlegg hos samtlige anlegg. Mekanisk avlusing tas ikke med i denne sammenheng. Et anlegg opplevde skarv i anlegget i forbindelse med utbrudd, men det er usikkert om skarven dukket opp før utbrudd eller underveis i utbruddet. Et annet anlegg opplevde mye skarv rundt matfiskanlegget etter klinisk utbrudd. Når antallet svimere og dødfisk økte så kom skarven. Det var ingen spesielle hendelser i driften til noen av anleggene i forkant og under utbrudd, for eksempel ombygging, ekstremvær, teknisk svikt eller lignende. Det var ingen endringer i fôring hos noen av anleggene.

Andre sykdommer på anleggene

Et anlegg hadde HSS (hemoragisk smoltsyndrom) rett i forkant av tenacibaculose utbruddet. Et annet anlegg opplevde vintersår etter utbrudd med tenacibaculose, og hadde i noen uker en kombinasjon av begge sykdommene. Et tredje anlegg opplevde utbrudd med CMS (Kardiomyopatisyndrom). Dette er en alvorlig hjertelidelse som typisk oppstår 14 - 18 måneder etter utsett i sjø. Det er nærliggende å tro at anlegget derfor ikke hadde problemer med CMS i forkant av tenacibaculose siden snutesårene på laksen oppstod 2-3 uker etter sjøsetting og tas derfor ikke videre med i diskusjon om risikofaktorer. Når det gjelder vaksinerings, opplyser 4 av 5 anlegg at de vaksinerer mot vintersår. Det siste anlegget hadde ikke konkret informasjon om fiskens vaksinestatus, da vaksinene gis på settefiskanlegget før utsett.

Diagnostikk og behandling

Samtlige anlegg stilte diagnosen tenacibaculose på bakgrunn av bakteriell undersøkelse etter klinisk mistanke. Bakteriologisk dyrkning og påvisning bekreftet *Tenacibaculum spp.* hos alle anlegg. Hos et anlegg var det artsbestemt til *Tenacibaculum finnmarkense*.

Fire av fem anlegg intensiverer plukking av dødfisk og svimere under utbrudd. Videre forsøkes forebyggende behandling ved å unngå håndtering og stress av fisken på fallende vanntemperaturer. Et anlegg har benyttet seg av antibiotikabehandling med florfenikol.

Vaksine mot snutesår

Fire av fem anlegg ville benyttet en vaksine mot tenacibaculose dersom det var tilgjengelig. Det siste anlegget var ikke interessert i en vaksine, da de hovedsakelig hadde problemer i 14 dager i løpet av sesongen.

Vurdering av problem

Et anlegg anser snutesår som et minimalt problem, et annet opplever det som et stort problem, mens to anlegg synes det er et moderat problem. Det siste anlegget har ikke svart på hvor stort problem de anser tenacibaculose for å være.

Diskusjon

Karakterisering av *Tenacibaculum* spp.

I denne fordypningsoppgaven har det blitt utført et utvalg av biokjemiske tester og molekylære metoder for å karakterisere *Tenacibaculum* spp. *Tenacibaculum* er et relativt nyopplaget bakteriegenus og det gjenstår mye forskning for å karakterisere bakterien fullstendig. Foreløpig er det *Tenacibaculum maritimum* som er den mest studerte bakterien i slekten. Et generelt problem ved flere av testene i denne studien har vært manglende bakterievekst, og dette har gjort det utfordrende å karakterisere bakteriene. Den manglende veksten kan skyldes at bakteriene ikke tåler enkelte stoffer tilsatt i mediene, at testene som ble benyttet ikke er tilpasset marine bakterier som vokser ved 15 °C, eller at ytre forhold ikke har vært optimale for bakteriens vekst, eksempelvis fuktighet, temperatur, saltinnhold og lignende. Likevel har vi kunnet innhente en del resultater gjennom studiene i laboratoriet og mange av resultatene fra de biokjemiske testene bekrefter funn fra en tidligere studie gjort i 2015 (12), følgelig at *Tenacibaculum* spp. er Gram-negative stavbakterier som er oksidase positive og indol negative. Resultatene skiller seg derimot fra samme studie når det gjelder katalasetesten og vekst på blodagar. Våre resultater viste at *Tenacibaculum finnmarkense* er katalase negativ og vokser på blodagar, mens nevnte studie konkluderte med at bakterien er svakt katalase positiv og ikke vokser på blodagar. Mulige årsaker til at disse testene avviker fra hverandre kan være at testene er ulikt utført og avlest. Studien fra 2015 har et svakt positivt resultat på katalasetesten mens vi har konkludert med at testen er negativ. Det vil alltid være en viss forskjell på hva som vurderes

som positivt og hva som vurderes som negativt ved svake reaksjoner. Til blodagartesten kan det ha blitt brukt ulik type agar som kan ha påvirket resultatet eller det har vært benyttet fullblod fra annen art enn det vi benyttet (fra sau).

Vi har observert en stor forskjell mellom *Tenacibaculum finnmarkense* og *Tenacibaculum maritimum* når det gjelder bakterienes morfologi. *Tenacibaculum finnmarkense* vokser i tydelige sennepsgule kolonier og har en viskøs og slimete konsistens. *Tenacibaculum maritimum* vokser derimot i pin-point kolonier som er blekere i fargen og har en betydelig mer klebrig konsistens. Sammenlignet med *T. finnmarkense* var det spesielt vanskelig å plukke *T. maritimum*-kolonier til de ulike biokjemiske testene og det kunne virke som om koloniene vokste ned i agaren. Det var ingen store forskjeller mellom *T. finnmarkense* og *T. maritimum* på de biokjemiske testene, bortsett fra katalasetesten.

Videre vil vi kommentere resultatene fra antibiotikaresistenstesten, der samtlige *Tenacibaculum* bakterier var resistente for de syv typene antibiotika det ble testet for. Dette kan tyde på at det tidligere har vært et lite bærekraftig antibiotikaforbruk som har ført til en resistens hos bakterien og som en konsekvens kan ikke disse antibiotikaene benyttes som behandling. Det er grunn for å tro at bakterien også har resistens mot andre antibiotika enn de syv som det er testet for. Antibiotikaresistens deles inn i naturlig og ervervet resistens. Naturlig resistens innebærer resistens som normalt forekommer hos bakterien eksempelvis dersom bakterien mangler angrepsmålet for antibiotikumet. Dette er egenskaper som overføres vertikalt mellom bakterier. Ervervet resistens er bakterier som tidligere har vært sensitive og som har utviklet en resistens som følge av forandringer i bakteriens genom via horisontal overføring eller gjennom mutasjoner. Antibiotikaresistens oppstår normalt ikke via mutasjoner i DNA-tråden, men ved horisontal overføring av plasmider som inneholder gener som koder for resistens (16). Videre studier bør inkludere en analyse av plasmid- eller genom-assosiert resistens.

I motsetning til *Tenacibaculum spp.* har den ukjente bakterien vokst godt i samtlige medier og har derfor vært en enklere bakterie å jobbe med på laboratoriet. Ved hjelp av biokjemiske tester ble det konkludert med at den ukjente bakterien er en gram negativ stav som er oksidase- og katalase positiv. Dermed rettet mistanken seg mot en vibrio-bakterie, nærmere bestemt *Vibrio splendidus*.

De molekylære metodene har vært enklere å utføre enn de biokjemiske metodene. Primerne som ble designet til utførelse av PCR er såkalte housekeeping gener. Dette er stabile gensekvenser som koder for grunnleggende funksjoner og uttrykkes til en hver tid.

På bakgrunn av sekvenseringsresultater fra Eurofins Genomics samt resultater fra PCR fikk vi bekreftet de ulike bakterieartene, bortsett fra bakterie nummer 1 der vi av usikker årsak ikke mottok resultater. Selv om bakteriene ikke er bekreftet med 100% sikkerhet, anser vi sikkerheten som høy nok til at vi kan konkludere med at dette er gjeldene bakterier. Dette viser at arbeidet vårt med molekylære metoder har vært vellykket.

Vurdering av risikofaktorer for utvikling av tenacibaculose

På bakgrunn av spørreundersøkelsen ser vi en stor sammenheng mellom utsett av smolt på lave og fallende vanntemperaturer og utvikling av tenacibaculose. Samtlige anlegg hadde utsett på fallende vanntemperaturer der temperaturen ved utsett hovedsakelig var rundt 4 grader. Historisk sett var det svært kalde vanntemperaturer i Troms våren 2018 som kan ha vært en medvirkende årsak til at anleggene med beliggenhet i Troms opplevde så kraftige utbrudd i forhold til tidligere. Vår oppfatning at utsett på kalde og fallende vanntemperaturer er en risikofaktor for utbrudd av tenacibaculose, bekreftes også fra tidligere studier (5, 17)

Utbruddene forekommer hovedsakelig 2 -3 uker etter utsett. Fisken har et nedsatt immunforsvar etter utsett grunnet nylig transport til matfiskanlegg, et høyere stressnivå og dermed også nedsatt appetitt. Ved transport oppstår det ofte mekaniske skader i hudbarrieren til fisken som følge av pumping og trenging som kan være en inngangsport for *Tenacibaculum* spp. Smoltifiseringsprosessen og overgang fra ferskvann til saltvann er også et stressende moment for fisken og bidrar til at sjøsetting er en sårbar periode.

Det ble ikke utført noen annen form for håndtering før utbrudd hos de fleste anlegg i studien som følgelig er hensiktsmessig da håndtering er stressende for fisken. Smoltifiseringsprosessen er en nødvendighet for laksen og transport fra settefiskanlegg er uunngåelig. Det er derfor viktig å bidra til at laksen har et best mulig utgangspunkt i forbindelse med sjøutsett og håndtering de første ukene etter utsett bør derfor unngås.

Med hensyn på mekanisk lusebehandling var det kun et anlegg som hadde rensefisk tilstede under utbrudd. Som nevnt innledningsvis kan leppefisk, rognkjeks og berggyllt infiseres med *Tenacibaculum* spp, men det er ingen klare studier som viser at det kan smitte over til laks. Vitenskapskomiteen for mat og miljø, VKM utførte en risikovurdering i 2017 for vurdering av smitte fra rensefisk til oppdrettslaks. *Tenacibaculum* spp. ble vurdert til og muligens kunne smitte fra rensefisk, men i svært liten grad og mindre sannsynlig at rensefisk er et reservoar. VKM sin generelle anbefaling er fullstendig brakklegging mellom innsett og videre at kun en liten andel av rensefisken gjenbrukes(18).

Vedrørende andre mekaniske avlusingsmetoder etter sjøsetting var det følgelig ikke lus på de fleste anlegg ved tenacibaculose-utbrudd da utbruddet hovedsakelig skjedde 2-3 uker etter sjøsetting. Etter kun noen få uker i sjø er det normalt sett ikke lus på laksen og dermed ikke

behov for lusebehandling. Et anlegg benyttet seg av thermolicer som mekanisk avlusing før utbrudd av tenacibaculose. Dette var anlegget som hadde utbrudd 4 - 5 måneder etter sjøsetting. Det kommer ikke frem fra spørreundersøkelsen når mekanisk avlusing ble gjennomført i forhold til utbrudd det er derfor vanskelig å si om det var en sammenheng mellom sår etter Thermolicer og utbrudd av tenacibaculose. Det er både fordeler og ulemper med mekanisk avlusning der en av ulempene er at håndteringen kan føre til skader i hudbarrieren og dermed være en inngangsport for *Tenacibaculum* spp.

Angående annen sykdom var det ett anlegg som hadde en mistanke om relasjon mellom annen sykdom til utbrudd av tenacibaculose. Dette anlegget opplevde hemorragisk smoltsyndrom, HSS, rundt sjøsetting og deretter tenacibaculose utbrudd noen få dager senere. Smoltkvaliteten ved dette anlegget var opplevd som god ved sjøutsett. Det kommer ikke frem fra svar gitt i spørreundersøkelsen hvem som vurderte smoltkvaliteten til å være normal og hva som ble utført av undersøkelser. Det er verdifullt med en fullstendig undersøkelse og obduksjon av smolt før utsett, men siden HSS ikke regnes som smittsomt virker det til å være enkeltindividets immunstatus og smoltfiseringsgrad som har en innvirkning for utvikling av HSS. HSS fører som regel ikke til særlig høy dødelighet og skal forsvinne etter noen få uker i saltvann, men det kan være en risikofaktor for sekundære patologi som eksempelvis tenacibaculose (19).

Det et klart flertall som ville benyttet seg av en vaksine dersom det var tilgjengelig. Et anlegg ønsket ikke å benytte seg av en vaksine siden sykdommen hovedsakelig kun varte i to uker. Forfatterne mener at dersom en vaksine blir tilgjengelig bør samtlige anlegg utsatt for tenacibaculose vaksinere laksen for å hindre sårutvikling, minske stress og smerte som følge av sykdom og etterstrebe en god fiskevelferd.

Det er tidligere utført vaksineforsøk mot *Tenacibaculum finnmarkense* der antistoffresponsen var god, men vaksinen hadde likevel dårlig effekt mot utvikling av tenacibaculose gjennom badesmitte. Flere ulike årsaker er diskutert der det konkluderes med at det viktigste er å finne riktig beskyttende antigen for vaksine. Det er videre diskutert i studien at det trolig ikke er *Tenacibaculum finnmarkense* som forårsaker sykdom, men derimot *Tenacibaculum maritimum* (7). Det er fortsatt mye vi ikke vet om *Tenacibaculum* spp. og det gjenstår mye forskning for å fullstendig forstå patogenesen og hvorvidt det er *Tenacibaculum maritimum* som faktisk forårsaker sykdom eller andre *Tenacibaculum* spp.

Profylakse alltid bedre enn behandling og med hensyn på forebygging er det ulike tiltak som kan iverksettes. Det bør sikres god smoltkvalitet på settefiskanlegget før utsett. Kontroll av dette bør utføres av veterinær eller fiskehelsebiolog med fullstendig undersøkelse og obduksjon. Transport til matfiskanlegg er naturlig nok stressende for fisken og det kan oppstå skader i hudbarrieren under pumpingen og selve transporten. Det er derfor hensiktsmessig å unngå lang transporttid for fisken for å redusere stressnivået før sjøsetting. Et svært viktig tiltak er å unngå utsett av smolt på lave og fallende temperaturer. Dette er i noen tilfeller uunngåelig med utsett på disse temperaturene, men dersom det kan unngås vil det være hensiktsmessig som et profylaktisk tiltak. Videre er vaksine et naturlig valg for å unngå og begrense sykdomsutvikling og en god profylaktisk behandling.

Begrensninger og generaliserbarhet

Den viktigste begrensende faktoren for laboratoriedelen av studien er manglende bakterievekst. Manglende vekst gjorde at vi ikke fikk resultater på enkelte av testene, i tillegg til at de resultatene vi fikk ble mer usikre. Et annet usikkerhetsmoment er at mange av de biokjemiske testene som ble utført er tester som er tilpasset bakterier som vokser ved 37 °C og passer dermed ikke like godt til kaldtvannsbakterier. Dermed kan man ikke være sikker på at prosedyrene og

avlesningen av resultater er den samme for disse bakteriene. Grunnet svært langsom bakterievekst var det antydning til inntørking av mediene i API 20E kitet. Dette kan ha ført til feil resultat. Underveis i arbeidet har vi måttet endre på enkelte av metodene siden bakteriene ikke har vokst. Eksempelvis utførte vi først antibiotikaresistens-testen på Mueller Hinton agar, men på grunn av manglende vekst måtte testen utføres på nytt på marin agar. Et annet eksempel er testene for indol, Hugh-Leifson og MRVP der vi underveis i forsøket måtte overføre bakterier og medium til større reagensglass for mer bevegelse i glassene og dermed bedre vekstvilkår. Dette hjalp til en viss grad.

Når det gjelder spørreundersøkelsen ser vi i ettertid at vi kunne lagt til noen spørsmål, eksempelvis utbruddets varighet, hyppighet av utbrudd og mer fokus på smoltkvaliteten ved utsett. Videre hadde det vært interessant å vite mer om transport fra settefiskanlegg, herunder antall timer i transport og hvilken type transport for en ytterligere vurdering av risikofaktorer. En pilotundersøkelse ble utført i forkant for å forebygge informasjonsfeil ved å sikre at spørsmålene var tydelig formulert. Vår generelle oppfattelse er at telefonintervjuer ga mer utfyllende svar og sikret mulighet for oppfølgingsspørsmål dersom noe var uklart.

Det var svært utfordrende å kartlegge aktuelle anlegg med utbrudd eller som har hatt tidligere utbrudd av tenacibaculose. I tillegg var svarprosenten for aktuelle anlegg lav. Utvalgets størrelse (n=5) er ikke nødvendigvis representativt for vår studiepopulasjon, atlantisk laks i Norge. Optimalt sett skulle vi hatt flere anlegg for en mer realistisk vurdering av risikofaktorer. Geografisk sett har anleggene beliggenhet i Troms og Nordland og vår referansepopulasjon er følgelig ikke nødvendigvis representativ for studiepopulasjonen. Den eksterne validiteten anses dermed å være svært begrenset. Imidlertid så samsvarer våre funn med hva andre studier har funnet som kan diskuteres om det styrker den eksterne validiteten i vår studie.

Prosedyrer for innsamling av data, analysering og tolkning ble nøye diskutert i forkant og underveis i studien for å unngå systematiske feil som klassifikasjonsfeil, seleksjonsfeil og tolkningsfeil. Ved å beskrive prosedyrer i forkant styrket dette validiteten og minimerte feilkilder. Den interne validiteten anses som god.

Konklusjon

Målene med oppgaven var å karakterisere *Tenacibaculum spp* og vurdere risikofaktorer for utvikling av tenacibaculose. Vi har utført en større andel biokjemiske tester og molekylære metoder for å beskrive *Tenacibaculum maritimum* og *Tenacibaculum finnmarkense* best mulig.

Tenacibaculum spp. er en gram negativ stav, oksidasepositiv, indol negativ og vokser på blodagar. Bakterien er resistent mot alle syv testede antibiotika, inkludert kanamycin og tetracyclin. I vår studie skiller *T. finnmarkense* seg fra *T. maritimum* ved at *T. finnmarkense* hadde en slimete, viskøs konsistens og vokste hovedsakelig i større kolonier, mens *T. maritimum* var svært klebrig og vokste utelukkende i pin point kolonier. Videre var *T. maritimum* katalase positiv, mens *T. finnmarkense* var katalase negativ.

Det er en påfallende sammenheng mellom utsett av smolt på lave og fallende vanntemperaturer og utvikling av tenacibaculose. De fleste anlegg i studiet opplevde i tillegg utbrudd 2- 3 uker etter sjøsetting. Som forebyggende tiltak mot tenacibaculose anbefales å sikre god smoltkvalitet før utsett og unngå utsett av smolt på lave og fallende vanntemperaturer. Videre kan det være fornuftig å redusere transporttid hos fisken fra settefiskanlegg til matfiskanlegg samt håndtering av fisken de første ukene etter sjøsetting. Vaksineforsøk er igangsatt og dersom en aktuell vaksine blir utviklet vil det være naturlig å nytte seg av denne som en effektiv profylaktisk behandling.

Takk til bidragsyttere

Forfatterne ønsker å takke alle som har hjulpet oss og veiledet oss underveis i forbindelse med denne studien. Vi ønsker å rette en stor takk til vår hovedveileder, Øystein Evensen, for god veiledning, faglige innspill og konstruktive tilbakemeldinger angående utforming av studien. Vi har satt stor pris på kreative løsninger underveis når det opprinnelige studiet måtte endres samt tålmodighet, engasjement og tilrettelegging. Vi vil takke vår medveileder Saurabh Dubey for et godt samarbeid, et stort engasjement og grundig opplæring med hensyn på labarbeid, herunder biokjemiske og molekylære metoder. Vi ønsker å takke Mustapha Lamkhannat for god hjelp og tilrettelegging av laboratoriske analyser. En stor takk rettes til Randi og Pål Haldorsen for hjelp til utforming av spørreundersøkelse. Takk til Fish Vet Group for innsendelse av bakteriekulturer som vi benyttet i vårt labarbeid. Vi ønsker å takke alle som har svart på spørreundersøkelsen og Marin Helse for et godt samarbeid underveis i studien. Til slutt ønsker vi å takke ansatte ved NMBU Campus Adamstuens biblioteket for opplæring i EndNote og utforming av referanseliste.

Summary

Title: Characterization of *Tenacibaculosis* spp. isolates from Atlantic farmed salmon and evaluation of different risk factors prior to tenacibaculosis.

Authors: Maren Fagerheim og Linn Beate Petersen Onsrud

Supervisor: Øystein Evensen and Saurabh Dubey

Norwegian University of Life Sciences

Tenacibaculosis has become an important cause of oral erosions in the upper and lower jaw in Atlantic salmon. The disease is caused by *Tenacibaculum* spp which is a relatively newly discovered bacterial group. The bacterial virulence and pathogenesis are still not fully known,

and requires further extensive research to map out. Various research projects have been initiated to acquire further knowledge of the bacterium as it has had an increasingly high impact on fish plant communities in the northern hemisphere.

The purpose of the study is to characterize the bacterium through laboratory work, as well as to investigate possible factors prior to disease through a questionnaire sheet. To learn more about the characteristics of the bacteria, we have performed various biochemical and molecular tests with *Tenacibaculum finnmarkense* and *Tenacibaculum maritimum*. The tests showed that *Tenacibaculum* spp. grows in circular colonies, are gram negative rods, oxidase positive and are indole negative. The bacteria have a widespread antibiotic resistance, a factor which is important to take into account ahead of initiation of any antibiotic treatment.

In order to identify possible risk factors prior to the disease, a questionnaire was sent out to fish farms that previously had outbreaks of Tenacibaculosis in the farm. Through analysis of the feedback it is concluded that the most important risk factor is exposure to cold and falling water temperatures, and as the disease often occurs in the weeks right after exposure to sea water, it is important to avoid factors that can cause stress in the fish during this period.

Referanser

1. Norges Sjømatråd. Sjømateksport for rekordhøye 94,5 milliarder i 2017 [Internett]. Norges Sjømatråd; 2018 [updated 8. januar 2018; cited 29. april 2019]. Available from: https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-rekordhoye-945-milliarder-i-2017/?fbclid=IwAR0PsxBIifCHmLSIivIM6yFRHJG2yH_C_JIMvQLoxRxOVpvvdDwlX70UPik.
2. Statistisk sentralbyrå. Akvakultur [Internett]. Statistisk sentralbyrå; 2018 [cited 26. februar 2019]. Available from: <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>.
3. Svåsand T, Grefsrud ES, Karlsen Ø, Kvamme BO, Glover KS, Husa V, et al. Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2017. Fisken og havet, særnr. 2-2017. [Internett]: Havforskningsinstituttet; 2017 26. februar 2019]. Available from: https://www.hi.no/filarkiv/2017/05/risikorapport_2017.pdf/nb-no.
4. Hjeltnes B, Jensen BB, Bornø G, Haukaas A, Walde CS. Fiskehelse rapporten 2018. Rapport 6a - 2019: Veterinærinstituttet; 2019. Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/fiskehelse rapporten-2018>.
5. Marin Helse. Bakteriesykdom Tenacibaculum [Internett]. Marin Helse; 2018 [cited 11. januar 2019]. Available from: <https://www.marinhelse.no/tenacibaculum/>.
6. Havforskningsinstituttet. Tenacibaculum spp [Internett]. Havforskningsinstituttet; 2018 [cited 11. februar 2019]. Available from: https://www.hi.no/temasider/sykdom_virus_bakterier_parasitter/sykdom_bakterier_virus_og_parasitter/tenacibaculum_spp./nb-no.
7. Småge SB, Frisch K, Vold V, Duesund H, Brevik ØJ, Olsen RH, et al. Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using Tenacibaculum finnmarkense and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. Aquaculture. 2018;495:858-64.

8. Frisch K, Småge SB, Johansen R, Duesund H, Brevik ØJ, Nylund A. Pathology of experimentally induced mouthrot caused by *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon smolts. *PloS one*. 2018;13(11):e0206951.
9. Hjeltnes B, Bornø G, Jansen MD, Haukaas A, Walde C. Fiskehelsesrapporten 2016. Rapport 4 - 2017 [Internett]: Veterinærinstituttet; 2017 [cited 26. februar 2019]. Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/fiskehelsesrapporten-2016>.
10. UiO institutt for biovitenskap. Gram negative bakterier [Internett]. UiO institutt for biovitenskap; 2011 [updated 17. januar 2019; cited 1. mars 2019]. Available from: https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gramne.html?fbclid=IwAR1FQCQX5csSOhmclUiDgOSE2GOH4GpEAHvBdWn8VrHRDYqv-zj2eX_0C2s.
11. Wold A, L Abèe-Lund T. Metode-kompendiet. Oversikt over metoder og tester som benyttes i bakteriologikurs og aktiv tjeneste for veterinærstudenter ved NVH. Canvas: Norges veterinærhøgskole; 2001.
12. BioMerieux. API 20E. Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods: BioMerieux; 2002 [cited 15. mars 2019]. Available from: <http://biomanufacturing.org/uploads/files/587872707301898351-api20einstructions.pdf?fbclid=IwAR3ceoNWTOAKQ2gZLL0u-VPldeg74jC1W60-MzZl2MBPssWyPVuVpE3WIFA>.
13. UiO institutt for biovitenskap. PCR [Internett]. UiO: institutt for biovitenskap; 2011 [updated 25. januar 2019; cited 4. mars 2019]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/pcr.html>.
14. Seachem. Medications; Kanaplex: Seachem; [cited 1. mars 2019]. Available from: <https://www.seachem.com/kanaplex.php>.

15. Tankeshwar A. API 20E Test System: Introduction, Procedure Results and Interpretations [Internett]. 2015 [cited 3. mars 2019]. Available from: <https://microbeonline.com/api-20e-test-system-introduction-procedure-results-interpretations/>.
16. Store norske leksikon. Plasmid [Internett]. Store norske leksikon; 2018 [cited 30. april 2019]. Available from: <https://snl.no/plasmid>.
17. Powelland J, Podlasly T. Tenacibaculum maritimum: Current Knowledge & Future Directions [Internett]2015 [cited 29. mars 2019]. Available from: http://www.caahs-bc.ca/sites/default/files/Tenacibaculum_maritimum_Workshop_Final_Report.pdf.
18. Rimstad E, Basic D, Gulla S, Hjeltnes B, Mortensen S. Risk assessment offish health associated with the use of cleaner fish in aquaculture [Internett]. Vitenskapskomiteen for mat og miljø; 2017 [cited 28. mars 2019]. Available from: <https://vkm.no/download/18.40cd61cf160507e9844ca6c/1513852770245/Risk%20assessment%20of%20fish%20health%20associated%20with%20the%20use%20of%20cleaner%20fish%20in%20aquaculture.pdf>.
19. Marin Helse. Hemorragisk Smolt Syndrom - HSS [Internett]. Marin Helse; [cited 28. mars 2019]. Available from: <https://www.marinhelse.no/hss/>.

Vedlegg

Følgeskjema til spørreundersøkelse:

NMBU Veterinærhøgskolen

Oslo, 29 januar 2019

Til aktuell aktør innen oppdrett av atlantisk laks

Spørreundersøkelse i forbindelse med fordypningsoppgave om snutesår/tenacibaculum- infeksjon.

Vi er to veterinærstudenter på 6. året, som har fordypning innenfor akvamedisin og som skriver fordypningsoppgave om snutesår på atlantisk laks. **Formålet med spørreundersøkelsen er å få informasjon om mulige faktorer som er typisk forutgående for snutesår.**

Vår oppgaveveileder er professor Øystein Evensen ved institutt for basalfag og akvamedisin (BasAm), NMBU Veterinærhøgskolen. Institutt for basalfag og akvamedisin er ansvarlig institutt for oppgaven, og støtter spørreundersøkelsen.

Dersom anlegget ikke har utbrudd av snutesår/tenacibaculum på nåværende utsett gjelder spørsmålene for det siste utsett som hadde problemer.

Trykk på «FYLL UT SKJEMAET», så kan man skrive svarene rett inn i skjemaet. Den tekniske utfyllingen foregår ved å sette kryss i rutene, eller skrive kommentar der det er aktuelt. Det er satt av plass til kommentarer alle steder der det er relevant. Kommentarer er ønsket, og vi er interessert i all informasjon som kan ha med forekomsten av snutesår å gjøre. Trykk «SEND» når skjemaet er ferdig utfylt.

Data vil bli lagret med passordbeskyttelse på våre datamaskiner, og med sikkerhetskopi på Veterinærhøgskolens servere. Uvedkommende får ikke adgang til data. **Ved publisering vil data være anonymisert slik at informasjon om den enkelte praksis ikke kan identifiseres.** Første spørsmål som gjelder navn på anlegg og lokalisasjon er kun for våre registrering av anlegg som har deltatt på undersøkelsen.

Deltakende anlegg får fordypningsoppgaven tilsendt om ønskelig.

Dersom du har spørsmål til skjemaet så ta kontakt med oss direkte eller via epost eller mobil. Vi tar kontakt igjen om to uker dersom vi ikke har mottatt spørreskjema innen da. Om du foretrekker det kan vi registrere data gjennom intervju på telefonen.

Vi setter veldig stor pris på at du tar deg tid til å delta på spørreundersøkelsen vår.

Vennlig hilsen

Maren Fagerheim

Mob: 46370135

Epost: maren.fagerheim@nmbu.no

Linn Beate P. Onsrud

Mob: 94884729

Epost: linn.beate.petersen.onsrud@nmbu.no

Spørreundersøkelse:

Spørreundersøkelse i forbindelse med fordypningsoppgave om snutesår/tenacibaculum-infeksjon

Dersom anlegget ikke har utbrudd av snutesår/tenacibaculum per dags dato, gjelder spørsmålene for det siste utsettet som hadde problemer.

Navn på anlegg og lokalisasjon: (dette er kun for egne registreringer av anlegg som har deltatt på undersøkelsen).

Har anlegget utbrudd av snutesår/tenacibaculum infeksjon nå? Dersom ikke, hvor lenge er det siden dere hadde det?

Oppstod sykdommen i alle merdene på anlegget, eller kun i enkelte?

Dersom kun enkelte merder ble angrepet; hva kan være mulig årsak til det?

Når på året ble fisken sjøsatt og hvor lenge etter sjøsetting oppstod utbruddet?

Hvor mye veide fisken ved utsett? Og hvordan var smoltkvaliteten?

Hva er vanntemperaturen i dag og hvordan har temperaturtrenden vært etter utsett? (stigende, fallende, jevn)? Hva er høyeste og laveste målte temperatur?

Hva er oksygenivået i merdene og hvordan har oksygentrenden vært etter utsett? (stigende, fallende, jevn)

Hva er saliniteten i vannet?

Endrer saliniteten seg gjennom året? Hva er høyeste og laveste målte salinitet?

Er det utført mekanisk avlusning på fisken? Hvis ja, hvilken metode?

- Børsting
- Spyling
- Thermolicer
- Hydrolicer
- Annen
- Nei, har ikke gjennomgått mekanisk avlusning

Hvor mange ganger har infisert utsett blitt mekanisk lusebehandlet?

Ble rensefisk benyttet under utbrudd? Hvis ja, hvor stor prosentandel?

Hva var lusetallet på anlegget under utbruddet?

Har det vært annen håndtering, transportering eller sortering av fisken etter utsett? (Sett bort i fra evt. avlusning). Hvis ja, hva har blitt gjort? (eks notvask)

Har det vært endringer i føringen etter utsett?

Har det vært skadedyr(oter, rovfisk osv) på anlegget etter utsett?

Har det vært utbrudd/økt dødelighet av annen sykdom enn snutesår på anlegget etter utsett? Hvis ja, hvilken?

Har dere hatt forekomst/problemer med vintersår?

Vaksinerer dere mot vintersår?

- Ja
- Nei
- Vet ikke

Har denne fisken blitt behandlet med antibiotika? Hvis ja, i hvilken sammenheng?

På en skala fra 0-4: anser dere snutesår/tenacibaculuminfeksjon som et problem på anlegget.

- 1. Anser det ikke som et problem
- 2. Minimalt problem
- 3. Moderat problem
- 4. Stort problem

Hvordan ble diagnosen snutesår stilt?

Ble det foretatt bakteriologiske undersøkelser av fisken, og i så fall, ble bakterier påvist og typebestemt?

Hvilke tiltak iverksettes ved eventuelle utbrudd av Tenacibaculum? (Eks antibiotikabehandling, avlivning av enkeltindivider, stamping out osv.)

Ville anlegget ha benyttet seg av en vaksine dersom det var tilgjengelig? Hvis ikke; hvorfor?

Har det vært hendelser eller endringer i driften etter utsett? Hvis ja, hvilke?

Andre kommentarer?

API avlesningstabell:

api® 20 E

07584D - GB - 2002/10

WASTE DISPOSAL

It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

WARRANTY

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABILITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

READING TABLE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
CIT	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate yellow reddish brown	
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	JAMES / immediate colorless pink pale green / yellow	
VP	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless pink / red (5)	
GEL	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

(1) A very pale yellow should also be considered positive.

(2) An orange color after 36-48 hours incubation must be considered negative.

(3) Reading made in the cupule (aerobic).

(4) Fermentation begins in the lower portion of the tubes, oxidation begins in the cupule.

(5) A slightly pink color after 10 minutes should be considered negative.

• The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.

• Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

SUPPLEMENTARY TESTS

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
Nitrate reduction GLU tube	potassium nitrate	0.076	NO ₂ production	<u>NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min</u>	
			reduction to N ₂ gas	yellow	red
MOB	API M Medium or microscope		motility	orange-red	<u>Zn / 5 min</u> yellow
McC	MacConkey medium		growth	non-motile	motile
OF-F	glucose (API OF Medium)		fermentation : under mineral oil	absence	presence
OF-O			oxidation : exposed to the air	green	yellow
				green	yellow

PROCEDURE
IDENTIFICATION TABLE
LITERATURE REFERENCES
INDEX OF SYMBOLS

p. I
p. II
p. IV
p. V



bioMérieux® sa
au capital de 11 879 045 €
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tel. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11



Printed in France

The logo is a registered and protected trademark of bioMérieux sa or one of its subsidiaries.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no