

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap
(IKBM)

Masteroppgave 2014
60 stp

Utvikling av en MultiLocus Variable Number Tandem Repeat Analyse (MLVA) for den fiskepatogene bakterien *Moritella viscosa*

Martin Hafskjold Sørgaard

Forord

Denne studien ble foretatt ved Veterinærinstituttet i Oslo, seksjon for bakteriologi - fisk og dyr, som del av et masterprogram ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige universitet, NMBU, institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM).

Jeg ønsker å takke min veileder på veterinærinstituttet, Duncan J. Colquhoun, for all hjelp og støtte han har gitt meg i forbindelse med dette prosjektet. Jeg ønsker også og takke de mange hyggelige ansatte ved veterinærinstituttet jeg har møtt, for gode hjelp og råd underveis.

Takk til Helge Holo for veiledning fra NMBU.

Jeg vil også takke venner, familie og kjæreste for all støtte og hjelp underveis i prosessen. Jeg setter veldig pris på dere. Ingen nevnt, ingen glemt.

Martin Hafskjold Sørgaard, Desember 2014

Sammendrag

Den Gram-negative bakterien *Moritella viscosa* forårsaker sykdommen «vintersår» i oppdrettsanlegg med laks og regnbueørret i Nord-Atlanteren når vanntemperaturen er lav. Vintersår er en økonomisk viktig sykdom i den norske oppdrettsnæringen, og er også et viktig dyrevelferdsproblem, da fisk som har sykdommen kan leve lenge med kroniske sår. Det finnes kommersielle vaksiner mot sykdommen, men det forekommer stadig utbrudd blant vaksinert laks og regnbueørret i Norge.

I denne studien ble det utviklet en Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for bakterien *M. viscosa*, og genet *gyrB* ble sekvensert og analysert i flere stammer av bakterien. Resultatene fra sekvenseringsanalysen viste en tydelig oppdeling av isolater i to grupper: «typiske *M. viscosa*», nesten utelukkende isolert fra laks, og «atypiske» *M. viscosa*, isolert fra flere forskjellige fiskearter. I MLVA grupperte de typiske isolatene sammen i en egen klade som korrelerte sterkt med *gyrB*-resultatene. De atypiske isolatene grupperte seg ikke sammen, men i tre klonale grupper. To av disse var assosiert med virulens og vertsspesifisitet; den ene gruppen bestod av relativt nye lakseisolater, og den andre av isolater utelukkende fra regnbueørret. Disse funnene kan være av betydning for utviklingen av fiskevaksiner mot vintersår. MLVA-metoden viste også at det ofte var flere enn en stamme av *M. viscosa* som ble isolert fra det samme utbruddet av vintersår, noe som er relevant epidemiologisk informasjon ved identifisering av stammer som forårsaker utbrudd. Metoden viste høy oppløsning ved typing av *M. viscosa*, men denne ble betraktelig lavere når kun lakseisolater ble analysert. Det bør foretas videre studier for å evaluere metoden for epidemiologisk bruk. Metoden er relativt rask å utføre, sammenliknet med andre genetiske analyser av *M. viscosa*, og burde være mulig å utføre i andre laboratorier med liknende utstyr.

Abstract

The Gram-negative bacterium *Moritella viscosa* causes the disease “winter-ulcer” in Atlantic salmon and rainbow trout farmed in the Northern Atlantic Ocean, during periods of low water temperature. Winter-ulcer is of significant economic importance for fish farms, and is also an animal welfare issue, since fish continue to live with chronic ulcers. There are commercial vaccines available against the disease, but outbreaks remain frequent among vaccinated salmon and rainbow trout in Norway.

In this study, a Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for the bacterium *M. viscosa* was developed, and the gene *gyrB* was also sequenced and analysed in several strains. Results of sequence analyses showed a clear division of isolates into two groups: “typical” *M. viscosa*, almost exclusively isolated from Norwegian salmon, and “atypical” *M. viscosa*, isolated from several fish species. In MLVA, the typical isolates grouped together in a clade that correlated strongly with the *gyrB*- results. Atypical isolates did not group together, but formed three clonal groups, two of which were associated with virulence and host specificity; one of these consisted of a group of relatively recent salmon isolates, and the other of isolates exclusively from rainbow trout. These findings may be of importance for the development of fish vaccines against winter-ulcer. The MLVA-method also showed that commonly, more than one strain of *M. viscosa* is isolated from the same outbreak of winter-ulcer. This is important epidemiological information relevant during identification of the strains responsible for the outbreak. The method showed high strain discrimination, though this was lowered considerably when salmon isolates alone were analyzed. More studies should be done to evaluate this method for use as an epidemiological tool. The method is relatively quick compared to other genetic analyses of *M. viscosa*, and should be portable to other laboratories with similar equipment.

1 Forkortelser

T _m	Melting Temperature (hybridiseringstemperatur for primere)
NVIO	Norges Veterinærinstitutt i Oslo
ABI	Applied Biosystems
MLVA	MultiLocus Variable number of tandem repeat Analysis
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
TR	Tandem Repeat (tandemrepetisjon)
POP	Performance optimized polymer
G	Guanin
A	Adenin
C	Cytosin
bp	Basepar
DdNTP	Dideoksyribonukleotidtrifosfater
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoksynukleotidtrifosfat
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerase kjedereaksjon
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
SSM	Slipped strand mispairing
T	Tymin
sp.	Species (Art)
TE-buffer	TRIS-EDTA-buffer
TBE-buffer	TRIS-bor-EDTA-buffer
UV	Ultraviolet - Ultrafiolett
MST	Minimum Spanning Tree
UPMGA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (uvektet pargruppet metode med aritmetisk middelværdi)
MB	MegaBaser (Million basepar)
LIF	Laser-Induced Fluorescence (laserindusert fluorescens)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl . Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (natrium dodecylsulfat – polyakrylamid gelelektroforese)
nt	nukleotid
N/A	Not Available (ikke tilgjengelig)

UCO Unequal Crossing Over (ulik overkryssing i forbindelse med rekombinasjon)

2 Innhold

1	Forkortelser	1
2	Innhold	3
3	Introduksjon	6
3.1	Vintersår og <i>Moritella viscosa</i>	6
3.2	Vaksinering og forekomst	7
3.3	Vertsspekter	8
3.4	Miljøpåvirkninger	9
3.5	Koinfeksjoner	10
3.6	Genus <i>Moritella</i>	11
3.7	Genetisk variasjon i <i>M. viscosa</i>	12
3.8	Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)	13
3.8.1	Variable Number of Tandem Repeat (VNTR).....	13
3.8.2	Slipped strand mispairing (SSM)	13
3.9	Hensikt.....	15
4	Materialer og metoder	16
4.1	Bakteriestammer	16
4.1.1	Bakterier	16
4.1.2	Epidemiologisk informasjon	16
4.2	Kultivering av bakterier og DNA-isolering.....	17
4.2.1	Utstrykning.....	17
4.3	Templat-DNA for PCR.....	17
4.4	Polymerase kjedereaksjon (PCR)	20
4.4.1	Primerdesign.....	21
4.4.2	PCR- amplifikasjon	21
4.4.3	Multipleks PCR med QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Hotstart).....	22
4.4.4	Agarose Gelelektroforese	23
4.4.5	Separasjon og deteksjon av PCR- produkt med kapillærelektroforese	23
4.5	DNA-sekvensering	24
4.5.1	DNA – sekvensering med Sangermetoden.....	24
4.5.2	PCR-Amplifikasjon	25
4.5.3	Rensing av PCR-produkt.....	25
4.5.4	DNA- sekvensering med MegaBACE 1000	25
4.5.5	DNA- sekvensering med 3130XL Genetic Analyzer.....	26
4.5.6	Separasjon av prøver med kapillærelektroforese	26
4.5.7	Analyse av sekvenser	27
4.6	Sekvensering av <i>gyrB</i> -genet	27
4.6.1	Primerdesign.....	27
4.6.2	Analyse av <i>gyrB</i> DNA-sekvenser.....	28
4.7	Utvikling av og analyse med Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)	30
4.7.1	Primerdesign.....	30
4.7.2	Utvikling av MLVA for agarose gelelektroforese	30
4.7.3	Identifisering VNTR- loki.....	30
4.7.4	Multipleks PCR- amplifikasjon av VNTR loki og separasjon med agarose gel elektroforese	31
4.7.5	Konvertering til MLVA for kapillærelektroforese fra agarose gelelektroforese.	

4.7.6	Analyse med kapillærelektroforese	33
4.7.7	Optimalisering av PCR- oppsett.....	34
4.7.8	Analyse av MLVA med kapillærelektroforese	36
4.7.10	Verifikasjon ved DNA-sekvensering	36
4.7.11	Spesifikk PCR for sammensatt repetisjon	37
4.7.12	Beregning av antall repetisjoner	38
4.7.13	Analyse av data med Bionumerics v. 6,1	39
4.7.14	BLAST-søk	40
4.7.9	Beregning av diversitetsindeks og test for rekombinasjon.....	40
4.7.10	Stabilitetstesting av VNTR-loki	42
5	Resultater.....	43
5.1	Sekvensering av <i>gyrB</i> –genet	43
5.2	Utvikling av og analyse med Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)	45
5.2.1	Utvikling av MLVA for agarose gelelektroforese	45
5.2.2	Identifisering av VNTR- loki	45
5.2.3	Multipleks PCR- amplifikasjon av VNTR loki og separasjon med agarose gelelektroforese	46
5.2.4	Konvertering til Kapillærelektroforese fra gel og analyse av VNTR.	46
5.2.5	Analyse med kapillærelektroforese	48
5.2.6	Optimalisering av PCR- oppsettet.....	48
5.2.7	Analyse av MLVA med kapillærelektroforese	50
5.2.8	Verifikasjon ved DNA -sekvensering.	51
5.2.9	Spesifikk PCR for sammensatt repetisjon	52
5.2.10	Analyse av data med Bionumerics v. 6.1	54
5.2.11	Klonale grupper.....	58
5.2.12	Geografi.....	59
5.2.13	Settefiskanlegg	59
5.2.14	Flere isolater fra samme anlegg og område.....	59
5.2.15	BLAST-søk	60
5.2.16	Beregning av diversitetsindeks og test for rekombinasjon.....	60
5.2.17	Stabilitetstesting av VNTR- loki	61
6	Diskusjon.....	62
6.1	Sekvensering av genen <i>gyrB</i>	62
6.2	Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)	63
6.2.1	Sammenlikning av <i>gyrB</i> - sammenstilling og MLVA.....	64
6.3	Evaluerer av MLVA som typingmetode; epidemiologi og populasjonsgenetikk ...	65
6.3.1	MLVA som epidemiologisk verktøy.....	65
6.3.2	Populasjonsgenetikk.....	66
6.3.3	Klonalitet og vaksinasjon	66
6.3.4	Utbruddsprofiler	70
6.3.5	Geografi.....	71
6.4	Metodologi.....	72
6.4.1	Sekvensering	72
6.4.2	Utvikling av MLVA.	72
6.4.3	Optimalisering av PCR.....	73
6.4.4	Analyse av data	73
6.4.5	Overføring til andre laboratorier	74
6.4.6	Sammensatt repetisjon.....	74
7	Konklusjon	76

8	Referanser.....	77
---	-----------------	----

3 Introduksjon

3.1 Vintersår og *Moritella viscosa*

Den Gram-negative bakterien *Moritella viscosa* (tidligere *Vibrio viscosus*) antas å være primærpatogenet ved sykdommen vintersår, som forekommer i oppdrettsfisk i vintersesongen når vanntemperaturen er under 10 °C (Lunder et al., 1995, 2000, Benediktsdóttir et. al, 2000) Navnet kommer av at den danner viskøse kolonier som trekker tråder når kolonier fjernes fra overflaten av fast dyrkningsmedium (Lunder et al., 2000, figur 1). Sykdommen vintersår beskrives vanligvis med sår langs siden på fisken (Figur 2), og kan utvikle seg til en systemisk infeksjon (Lunder et al., 1995, Benediktsdóttir, et al., 1998). Under utbrudd av vintersår isoleres *M. viscosa* vanligvis fra sår og nyre hos fisk med åpne sår, men kan også isoleres fra nyre hos fisk uten sår (Lunder 1995). Dødeligheten er ofte begrenset, men kan være betydelig i enkelte utbrudd (Lunder, 1990, Tørud og Håstein, 2008). For fisk som har overlevd vil sårene gro igjen om våren når havtemperaturen øker (Lunder et al., 1995). Sykdommen ansees som et dyrevelferdsproblem, da fisk som ikke dør lever videre med åpne sår (Fiskehelse rapporten 2011, Tørud og Håstein, 2008). Økonomiske tap skyldes, i tillegg til død fisk, også dårlig kvalitet på slaktet fisk på grunn av arrdannelse (Lunder 2000).



Figur 1. Trådtrekkende, viskøse kolonier med *M. viscosa* (Bilde: D. J. Colquhoun, NVIO).



Figur 2. Laks med vintersår (Bilde: NVIO).

3.2 Vaksiner og forekomst

Vintersår har vært kjent siden 1980-tallet og var da i hovedsak forbundet med oppdrett av Atlantisk laks (heretter referert til som «laks», Lunder, 1990). *M. viscosa* er også funnet i forbindelse med vintersår i Skottland (Bruno et al. 1998), Canada, Færøyene, (Grove et al., 2010) og på Island (Benediktsdóttir et al., 1998). Sykdommen ser ikke ut til å forekomme utenfor Nord-Atlanteren (Colquhoun og Lillehaug, 2014).

Vaksiner mot *M. viscosa* har vært kommersielt tilgjengelig i Norge siden 1999 (Greger og Goodrich, 1999), og på Island siden 1993, og er en del av en multikomponent olje- adjuvert vaksine med formalininaktiverte bakterier (Gudmundsdóttir og Björnsdóttir, 2007). Disse vaksinene baseres på kun én injeksjon under ferskvannsstadiet, som gir beskyttelse gjennom hele vekstperioden i saltvann (Lillehaug, 2014). Det ble solgt 347,4 millioner oljebaserte vaksiner for laks og ørret i Norge i 2011, og 98,1 prosent av disse inneholdt en vintersårkomponent. Av vaksinene ble 94,8 prosent anvendt på laks, og 5,2 prosent på regnbueørret (Legemiddelindustrien, 2012). Av totalproduksjonen av laksefisk det året på 302,5 millioner utsatte fisk, er 93 prosent laks, og 7 prosent regnbueørret (Fiskeridirektoratet, 2014a). Fordeling av vaksiner mellom fiskeartene med hensyn til innhold av

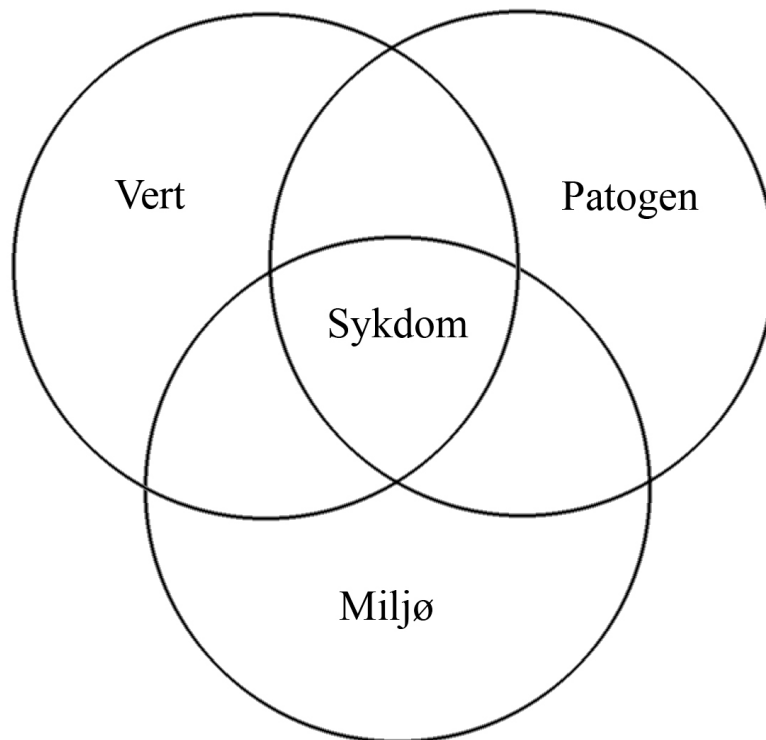
vintersårkomponent er ikke tilgjengelig, men det er tydelig at det aller meste av oppdrettslaks, og også en stor andel av regnbueørret nå blir vaksinert også mot vintersår i Norge. Til tross for dette, ble det i 2011 rapportert om funn av *M. viscosa* på 62 lokaliteter med oppdrettslaks, i tillegg til 7 lokaliteter med regnbueørret. At sykdommen ikke er meldepliktig gjør også at den faktiske forekomsten er vanskelig å fastslå (Veterinærinstituttet, 2012). I tillegg gjør de særegne viskøse koloniene gjør den lett å diagnostisere for lokale veterinærer, noe som kan hindre at statistikken blir fanget opp ved Veterinærinstituttet (D. J. Colquhoun, pers. komm., 12. august 2014). Utbrudd av vintersår er en av de bakterierelaterte sykdommene som forårsaker størst økonomiske tap i norsk fiskeoppdrett (Grove et al. 2010, Colquhoun og Lillehaug, 2014). Tidligere har vintersår vært et stort problem på Island, spesielt i årene 1992-1993. Innføring av vaksine i 1993 bedret dette vesentlig. All laks på Island blir nå vaksinert, og det er få tilfeller av sykdommen. Regnbueørret blir ikke vaksinert, og vintersår forekommer av og til, men det er normalt lav dødelighet. På Island var det i årene 2011, 2012 og 2013 henholdsvis 1, 3 og 2 utbrudd av vintersår. Island har i dag til sammen 35 oppdrettsanlegg av laksefisk: laks (10), røye (26) og regnbueørret (9), og hadde i 2011 en produksjon i overkant av 4000 tonn av disse artene (Gísli Jónsson ved MAST, Mat og Veterinærtilsynet på Island, pers. komm., 6. mai 2014). Til sammenlikning hadde Norge 1020 lokaliteter i 2011 for laks, regnbueørret og ørret, med en total produksjon på 1,1 millioner tonn (Fiskeridirektoratet, 2013).

3.3 Vertsspekter

M. viscosa isoleres nå årlig fra utbrudd av vintersår i oppdrettsanlegg med regnbueørret i Norge, i tillegg til å fortsatt være et stort problem hos laks (Veterinærinstituttet, 2011, 2012 og 2013). Selv om det er uklart om den forårsaker sykdom i de følgende artene, isoleres den iblant fra torsk (Colquhoun et al., 2004), og mer sjeldent fra kveite, i tillegg til grønngylt, og også nå berggylt som brukes som rensefisk mot lakselus (D. J. Colquhoun, NVIO, pers. komm. 12.08.14). Bakterien er også funnet på en viltfanget rødspette som utviklet sår etter å ha blitt holdt fem måneder i merde som avlsfisk (Lunder et al., 2000), og en stamme med lav virulens ble isolert fra gjellene til en frisk rognkjeks på Island (Benediktsdóttir et al., 2000). Det er også vært et alvorlig utbrudd av sykdommen i et sjøbasert oppdrettsanlegg med uvaksinert røye på Island, med opptil 10 % mortalitet. Dette problemet forsvant etter bytte til en vaksine som inneholdt *M. viscosa* (G. Jónsson, pers. komm., 6. mai 2014).

3.4 Miljøpåvirkninger

Smittsomme mikroorganismer er avhengig av miljøet for å kunne forårsake sykdommer hos verten, også i fisk (Figur 3). I varierende grad kan flere forskjellige stressfaktorer gjøre at fisk blir mer disponibel for en sykdom. For eksempel er temperatur ofte av stor betydning, da den påvirker blant annet både immunsystemet til fisken og mikroorganismens evne til å skape sykdom (Snieszko, 1974).



Figur 3. Basert på Snieszko (1974): Patogene mikroorganismer forårsaker sykdom hos en vert først når miljøbetingelsene er riktige.

Vintersår forårsaket av *M. viscosa* er miljøbettinget på flere måter. Temperatur, saltinnhold, og til dels mekanisk skade er viktige faktorer for at sykdommen skal inntreffe:

Lillehaug et al. (2003) rapporterte at antibiotikabehandlinger mot vintersår i perioden 1991 til 2000 ikke forekom i månedene juli til september. I månedene mai, juni, oktober og november var det 15, mens fra desember til april 119 antibiotikabehandlinger. Det er altså en sterk korrelasjon med lav vanntemperatur og vintersår, dog noe av denne effekten kan komme av røffere sjø i vintermånedene, som kan forårsake mekanisk skade. Lunder et. al (1995) rapporterte at mekanisk skade var en forutsetning for sårdannelse hos frisk fisk i kohabitasjon med syk fisk. Om skader ikke nødvendigvis er en forutsetning, så gjør skade på fisken den

mer disponibel for sykdommen (Karlsen et al., 2012). I smitteforsøk har det blitt observert reversering av dødelighet ved økning av vanntemperatur og redusering av salinitet (Løvoll et al. 2009). Ved dyrking i laboratoriet krever *M. viscosa* 1-4 % NaCl i mediumet, og vokser på temperaturer mellom 4 og 25 °C (Lunder 2000). Den vokser raskest ved 15 °C, men høyest stabilitet og antall levende celler oppnås ved 4 °C, og 3- 4 % NaCl er optimal saltkonsentrasjon i vekstmediet (Benediktsdottir og Heidarsdottir, 2007, Tunsjø et al. 2007). Dette reflekterer at *M. viscosa* er en marin bakterie; sjøvann har et relativt stabilt saltinnhold på 3,5 % (Hav, 2014), og at utbrudd av vintersår forekommer når vannet er kaldt.

3.5 Koinfeksjoner

Selv om *M. viscosa* ofte isoleres sammen med bakterien *Aliivibrio wodanis*, (reklassifisert fra *Vibrio wodanis*, Urbanczyk et al., 2007) er det av disse kun *M. viscosa* som har forårsaket vintersår under smitteforsøk (Lunder et al, 2000). Likevel antyder nyere forskning at *Vibrio wodanis* kan være involvert i å forlenge sykdomsforløpet (Karlsen et al., 2014a). Nylig er det gjennom blant annet histopatologiske undersøkelser av vintersår fra to perioder, 1996 og 2004-2005, funnet to grupper av bakterier fra genus *Tenacibaculum*. Fra de to periodene ble bakterier fra en av disse gruppene funnet i henholdsvis 70 og 62,5 prosent av prøvene fra sår, og ofte (men ikke alltid) sammen med *M. viscosa*. Smitteforsøk viser at denne gruppen av *Tenacibaculum* sp. forårsaker sår i hud og hornhinne (figur 4), i tillegg til at den raskt ble etablert som koinfeksjon i sår som allerede var forårsaket av *M. viscosa*. Dette indikerer at den antakelig spiller en viktig rolle i forbindelse med vintersår i Norge, dog den eksakte patogenetiske betydningen fortsatt er uklart (Olsen et al., 2011). De siste årene er *Tenacibaculum* sp. blitt isolert både sammen med *M. viscosa* og i renkultur i forbindelse med vintersår (Veterinærinstituttet, 2011, 2012 og 2013).



Figur 4 Laks med sår forårsaket av *Tenacibaculum sp.* Bilde: D. J. Colquhoun, NVIO.

3.6 Genus *Moritella*

M. viscosa hører til genus (slekten) *Moritella*, som består av marine, psykrofile (kuldeelskende), halofile (salt-elskende), Gram-negative stavbakterier. Det er beskrevet sju arter i genuset (tabell 1), hvorav 4 er barofile (trykk-elskende). Av disse er det kun *M. viscosa* som er kjent som patogen (Heidarsdottir et al., 2008). Typestammen i genuset er *Moritella marina* (Urakawa et al, 1998), tidligere *Vibrio marinus*, og ble isolert fra en vannprøve fra 1200 meters dyp nordøst i Stillehavet, utenfor kysten av Oregon, der temperaturen var 3,24 °C (Colwell og Morita, 1964). *Moritella dasanensis* ble isolert fra overflatevann med temperatur 3 °C ved en isbre i Kongsfjorden på Svalbard (Kim et al, 2008). De barofile medlemmene av slekten ble alle isolert fra dypvannssedimenter; *Moritella yayanosii* (obligat barofil) bunnen av Marianergropen, 10 898 m (Kato et al, 1998, Nogi og Kato, 1999), *Moritella japonica*; Japangropen, 6365 m (Nogi et al, 1998), *Moritella profunda* og *Moritella abyssi*; kysten av vest- Afrika, 2815 m (Xu et al, 2003).

Tabell 1. Medlemmer av genus *Moritella*

Bakterieart	Typestamme	Barofil
<i>Moritella abyssii</i>	JCM 11436	Ja
<i>Moritella dasanensis</i>	ArB 0140	Nei
<i>Moritella japonica</i>	JCM 10249	Ja
<i>Moritella viscosa</i>	NCIMB 13584	Nei
<i>Moritella marina</i>	ATCC 15381	Nei
<i>Moritella profunda</i>	JCM 11435	Ja
<i>Moritella yayanosii</i>	JCM 10263	Obligat

3.7 Genetisk variasjon i *M. viscosa*

Sekvensering av 16S rRNA fra *M. viscosa* gir liten resolusjon, men egnes godt til å differensiere mellom de forskjellige artene i genus *Moritella* (Grove et al., 2010). Benediktsdottir et al. (2000) rapporterte om geografisk gruppering av isolater fra Island og Norge ved amplifisert fragmentlengde polymorfisme (AFLP) og SDS- polyakrylamid gelelektroforese (sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). De islandske isolatene dannet en hovedklynge med tre undergrupperinger, der to av gruppene reflekterte det geografiske opphavet, i tillegg til en lavvirulent stamme isolert fra rognkjeks som stod alene. De norske isolatene (alle fra Atlantisk laks mellom 62 og 65 °N) grupperte seg i en egen, relativt homogen klynge. I en studie fra 2010 rapporterte Grove et al. om flere tilfeller av vintersår med høy dødelighet i oppdrett av regnbueørret. Studien, som dette prosjektet er en del av, omfattet *M. viscosa* isolert fra forskjellige vertsfisker og geografisk opphav, og viste at isolatene ble tydelig separert i to grupper ved sekvensering og sammenstilling av *gyrB*- genet, puls felt gelelektroforese (PFGE), plasmideprofilering, og hemolytisk aktivitet. Den ene grupperingen inneholdt med ett unntak (isolert fra torsk), *M. viscosa* isolert kun fra laks i Norge, Færøyene og Skottland, og betegnes som «typiske» isolater. Den andre gruppen bestod av stammer fra flere fiskearter; laks, regnbueørret, torsk og rognkjeks fra Island, Canada og Norge, betegnes som «atypiske» *M. viscosa*. Den sistnevnte gruppen var i PFGE- analysene markant mer heterogen enn den første.

3.8 Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

3.8.1 Variable Number of Tandem Repeat (VNTR).

Direkte tandemrepetisjoner (TR) er kopier av en DNA- sekvens som repeteres flere ganger på rad i samme retning (Tandem Repeat Sequences, 1999). I 2006 ble slike sekvenser funnet i alle organismer der hele genomet var blitt sekvensert. Repeterende elementer har ofte høy mutasjonsrate, gjennom insersjoner og delesjoner av kopiene (Bichara et. al, 2006).

Variasjoner i antall kopier mellom beslektede individer kalles «Variable Number of Tandem Repeats», og er forårsaket av endringer i antall kopier av den repeterende enheten (Levinson og Gutman, 1987, Bichara et. al, 2006). Analyse av polymorfisme i flere variable tandemrepetisjoner, «Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis» (MLVA), benyttes i flere sammenhenger, og er mest kjent som genetiske fingeravtrykk, brukt i kriminalteknikk og avlsanalyser (van Belkum et al., 1998, van Belkum, 2007). Det er også utviklet flere metoder for analyse og sporing av medisinsk relevante bakterier med MLVA. Disse baserer seg i hovedsak på PCR- amplifikasjon etterfulgt av størrelsesbedømmelse av fragmenter med agarose gelelektroforese eller kapillærelektroforese (Lindstedt, B. A. 2005, van Belkum, 2007). Det er økende bruk av disse, da det er en hurtig metode for typing av bakterier med høy oppløsning, og dagens nye metoder er vanligvis basert på automatisering med kapillærelektroforese (Lindstedt et al. 2013).

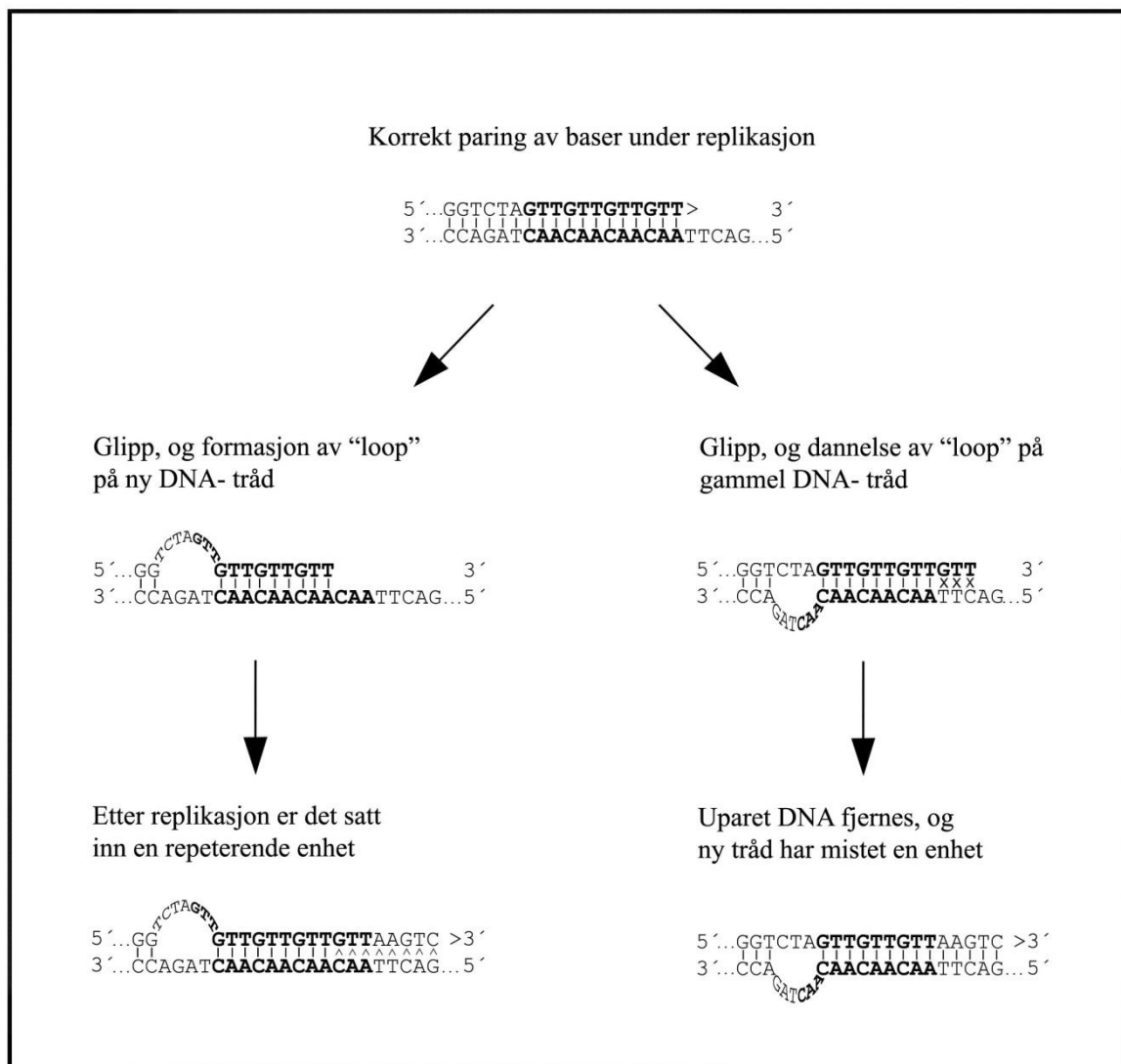
3.8.2 Slipped strand mispairing (SSM)

Levinson og Gutman (1987) foreslo «slipped strand mispairing» (SSM, «glipp ved trådsammenstilling) som hovedmekanismen bak opprinnelsen til, og variasjonen i, repeterende DNA. Fordi de to trådene i DNA- heliksen passer sammen flere enn ett sted innenfor ett område som inneholder en repeterende sekvens, kan det lettere oppstå en feilkobling mellom trådene, som medfører at det forsvinner eller legges til en repeterende enhet under replikasjon:

Ved en glipp av tråden under DNA- replikasjon (figur 5, øverst) vil det oppstå en «loop» på den ene tråden ved siden av det repeterende området. Den nye tråden blir kortere eller lengre enn den opprinnelige tråden. Hvis loopene former seg på den nye tråden (figur 5, venstre), idet det repeterende område kopieres, vil det komme til en eller flere enheter. Hvis det skjer på

templattråden (figur 5, høyre), kan den nye tråden bli kortere, på grunn av eksisjon av feilparet DNA som gjenkjennes av cellens DNA-reparasjonsmekanismer.

Det kan også oppstå en denaturering og feilkobling i dobbeltrådet DNA, med en loop oppstrøms og nedstrøms for repetisjonsområdet. Hvis dette blir gjenkjent av DNA-reparasjonsmekanismene i cellen, kan feilaktig eksisjon etterfulgt av reparasjon med den andre tråden som templat, gi både delesjoner og insersjoner.



Figur 5. Slipped strand mispairing (SSM), basert på Levinson & Gutman (1987): «Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution», (figur 2).

Levinson og Gutman (1987) foreslo også andre mekanismer som kan være involvert, men i mindre grad, blant annet «unequal crossing over» (UCO, «ulik overkryssing»), i forbindelse med rekombinasjon. Dette støttes av studien av Vogler et al. (2006), som konkluderer med at

kun 6,5 % av mutasjonene i deres studie av VNTR-loki i *E. coli* så ut til å komme av andre mekanismer enn SSM, der rekombinasjon (UCO) sannsynligvis var involvert.

3.9 Hensikt

Vintersår fortsetter å være et problem i norsk fiskeoppdrett, til tross for at det er omfattende vaksinasjon mot sykdommen. Å belyse genetisk variasjon i den antatte hovedpatogene bakterien, *Moritella viscosa*, vil hjelpe til i utvelgelse av stammer av bakterien som kan brukes i vaksineutvikling. Det vil også kunne være med på å gi innsikt i populasjonsgenetiske spørsmål om klonalitet, vertsspesifisitet, og geografisk fordeling, og muligens epidemiologiske spørsmål som smitekilder, smittespredning og utbruddsprofiler.

Hensikten med denne studien var å utvikle en MultiLocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *M. viscosa*, for å belyse den genetiske variasjonen i arten, og å validere metoden som et verktøy for undertyping av *M. viscosa* isolert fra vintersårutbrudd. I tillegg var dette en del av en studie beskrevet av Grove et al. (2010), gjennom sekvensering av husholdningsgenet *gyrB* i *M. viscosa* og beslektede bakterier.

4 Materialer og metoder

4.1 Bakteriestammer

4.1.1 Bakterier

Denne studien omfatter 106 stammer av *Moritella viscosa* fra forskjellige oppdrettslokaliteter, år og fiskearter. I noen tilfeller er det inkludert flere isolater med opprinnelse fra det samme anlegget, og et isolat fra hver innsendelse til veterinærinstituttet i Oslo (NVIO) for vinteren 2011 (01.01.11-25.03.11) ble tatt med i studien. I tillegg er seks stammer fra Island, og to fra både Skottland, Færøyene og Canada inkludert. *M. viscosa*-isolatene i veterinærinstituttets frysearkiv er tidligere blitt identifisert etter fenotypiske tester beskrevet av Colquhoun et al., (2004; tabell 1). I tillegg til det er ”ingen vekst ved 0,5 % NaCl” et kriterium for identifisering, og det er i tvilstilfeller foretatt 16S rRNA-sekvensering (Duncan J. Colquhoun, NVIO, pers. komm. 21.03.14). Som referansestammer ble *Moritella japonica* (JCM 10249) bestilt fra JCM RIKEN BioResource Center¹ (Japan), mens *Moritella marina* (NCIMB 1144) er tilgjengelig lokalt ved NVIO. Et isolat av ukjent art (stamme NVIO 5353, fra Canada) som var markert som «mulig *M. viscosa*» i den lokale bakteriedatabasen ved NVIO er også inkludert.

4.1.2 Epidemiologisk informasjon

Det ble hentet inn informasjon om virulens blant *M. viscosa*-isolatene fra saksinformasjon og anamneser i journaler i databasen og i arkiverte permer ved veterinærinstituttet i Oslo. I tillegg ble sakspapirer tilsendt fra Veterinærinstituttene i Bergen, Trondheim og Harstad, og noe baseres på personlig kommunikasjon (D. J. Colquhoun, per. komm., 28.02.04). Fra denne informasjonen ble virulensgraden delt inn i tre kategorier:

Grad 0: ”Sekundærinfeksjon², isolert fra tilsynelatende frisk, eller tilfeldig død fisk.”

Grad 1: ”Utbrudd av vintersår, moderat med sår og dødelighet.”

Grad 2: ”Høy dødelighet eller svært mye sår.”

1 Bakteriene *Moritella profunda* og *Moritella abyssi* ble bestilt samtidig, men det var ingen vekst ved inkubasjon.

2 Ved utbrudd der det var koinfeksjon med *Aliivibrio wodanis* eller *Tenacibaculum* sp., ble tilfellet ikke ansett som sekundærinfeksjon.

For isolater der det var for mangelfull informasjon til å bestemme en kategori ble virulensgraden designert N/A. Enkelte isolater er gitt virulensgrad etter publiserte artikler som omtaler virulens, eller personlig kommunikasjon (se fotnoter, tabell 2). Informasjon om geografisk opphav, fiskeart og år ble også funnet i journaler, i tillegg til bakteriedatabasen ved veterinærinstituttet og i publikasjoner. Manglene informasjon ble merket N/A. En oversikt over stammer, med lokalt frysernummer ved NVIO (stammenummer), eventuell alternativ betegnelse, geografisk opphav³, år, fiskeart og virulens er gitt i tabell 2. Tabellen inneholder også anleggskoder for anlegg der det ble isolert flere enn en stamme av *M. viscosa*, og i tilfeller der det var innsendelser både fra et settefiskanlegg og senere fra sjøanlegg etter utsett av fisken.

4.2 Kultivering av bakterier og DNA-isolering

4.2.1 Utstrykning

Bakterieisolater ble strøket ut fra frysemedium med 20 % (v/v) glyserol i fryser ved -80 °C på blodagar med 5 % saueblod og 2 % NaCl. Skålene ble inkubert ved 15 °C i 2- 4 døgn til synlig vekst. Hvis skålene hadde få kolonier, ble bakterier fra en koloni strøket ut på en ny skål og inkubert på nytt. For de første undersøkelsene ble det sådd ut 12 stammer av *M. viscosa* i tillegg til *M. marina*. Bakteriologilaboratoriet ved seksjon for fiskehelse (NVIO) strøk senere ut *M. japonica*, 56 stammer av *M. viscosa*, og ett isolat av ukjent art som var markert som «mulig *M. viscosa*».

4.3 Templat-DNA for PCR

Tre til sju kolonier, avhengig av størrelse, ble overført Eppendofrør med 500 µl 1 x TE-buffer (10mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.0 mM EDTA). Rørene ble vortekset og bakteriene ble lysert på blokk ved 100 °C i 10 min. Etter nedkjøling til romtemperatur ble rørene sentrifugert med en bordsentrifuge på 10000 rcf (g) i 2 min, og supernatanten oppbevart i fryser ved -20 °C og brukt videre som templat.

Øvrig DNA- templat var allerede isolert fra *M. viscosa* til forskjellige formål ved veterinærinstituttet i Oslo, med det automatiske DNA- ekstraksjonsapparatet NucliSENS[®] EasyMAG[®] (bioMérieux), eller andre metoder som er ukjente.

³ Studien benytter seg for det meste av mer nøyaktig geografisk informasjon enn i tabellen, men informasjonen er blitt anonymisert her.

Tabell 2. Stammer som er inkludert i denne studien, samt årstall, vertsfisk, geografisk opprinnelse, virulensgrad og anleggskoder. Foruten B og C og I, indikerer bokstaven i anleggskoden et område, og tallet etter bokstaven er spesifikt anlegg med merder i dette området. B1,C1 og I1 er settefiskanlegg, og B2, C2 og I2 er anleggene hvor fisken ble satt ut kort tid i etterkant. De to siste siffer i anleggskoden indikerer årstall for isolasjon.

Stammenummer (NVIO)	Alternativ betegnelse/ acc. Nr	År	Vertsfisk	Geografisk opprinnelse	Virulensgrad	Anleggskoder
NVIO 1527		1990	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 2033	NCIMB 13584	1988	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 2808		1994	Laks	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 2989		1995	Laks	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 3041		1995	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 3049		1995	Laks	Møre og Romsdal	2	
NVIO 3498		1996	Laks	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 3968		1999	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	
NVIO 3979		1999	Regnbueørret	Møre og Romsdal	2	
NVIO 3999		1999	Laks	Møre og Romsdal	1***	
NVIO 4131		2000	Regnbueørret	Møre og Romsdal	0	
NVIO 4178		2000	Laks	Møre og Romsdal	2	I1-00
NVIO 4179		2000	Laks	Møre og Romsdal	2	I2-00
NVIO 4397		2001	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 4480		2002	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 4547		2002	Torsk	Hordaland	0	A1-02
NVIO 4548		2002	Torsk	Hordaland	0	A1-02
NVIO 4679		2003	Laks	Møre og Romsdal	1	B1-03
NVIO 4692		2003	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	
NVIO 4711		2003	Laks	Møre og Romsdal	2	C1-03
NVIO 4714		2003	Laks	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 4731		2003	Laks	Møre og Romsdal	2	C2-03
NVIO 4743		2003	Laks	Møre og Romsdal	1	B2-03
NVIO 4744		2003	Laks	Møre og Romsdal	1	B2-03
NVIO 4869		2004	Regnbueørret	Sør-Trøndelag	1***	
NVIO 4870		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	N/A	D3-04
NVIO 4889		2004	Laks	Finnmark	N/A	
NVIO 4910		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	D1-04
NVIO 4917		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1**	D1-04
NVIO 4918		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	D2-04
NVIO 4920		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	D1-04
NVIO 4957		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	N/A	D3-04
NVIO 4958		2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	N/A	D3-04
NVIO 5168		2005	Regnbueørret	Møre og Romsdal	0	
NVIO 5204		2005	Torsk	Nord-Trøndelag	0	
NVIO 5351	Vvi-7	N/A	Laks	Canada	0**	
NVIO 5352	Vvi-11	N/A	Laks	Canada	0**	
NVIO 5355		N/A	Laks	Norge	1	
NVIO 5433		2006	Laks	Nordland	1***	
NVIO 5443		2006	Laks	Vest-Agder	1***	
NVIO 5450		2006	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1***	
NVIO 5471		2006	Torsk	Sør-Trøndelag	0	E-06
NVIO 5472		2006	Torsk	Sør-Trøndelag	0	E-06
NVIO 5473		2006	Torsk	Sør-Trøndelag	0	E-06
NVIO 5474		2006	Torsk	Sør-Trøndelag	0	E-06
NVIO 5475		2006	Torsk	Sør-Trøndelag	0	E-06
NVIO 5482		2006	Torsk	Møre og Romsdal	0	
NVIO 5507		2006	Torsk	Nordland	N/A	
NVIO 5683		2007	Regnbueørret	Hordaland	1	
NVIO 6050		2007	Regnbueørret	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 6054		2007	Regnbueørret	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 6094		2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 6103		2008	Laks	Rogaland	N/A	
NVIO 6124		2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	

(Tabellen fortsetter neste side)

Tabell 2. Fortsettelse fra forrige side.

Stammenummer (NVIO)	Alternativ betegnelse/ acc. Nr	År	Vertsfisk	Geografisk opprinnelse	Virulensgrad	Anleggskoder
NVIO 6159		2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	F1-08
NVIO 6160		2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1	F1-08
NVIO 6184		2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1***	D4-08
NVIO 6185		2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal	1***	D4-08
NVIO 6216		2008	Laks	Møre og Romsdal	1	K1-08
NVIO 6217		2008	Laks	Møre og Romsdal	1	K1-08
NVIO 6219	K 2	N/A	Laks	S. V Island	N/A	
NVIO 6220	K 56	N/A	Laks	N. Island	1*	
NVIO 6221	K 58	N/A	Laks	S. V Island	1**	
NVIO 6222	F 57	N/A	Rognkjeks	S. V Island	0*	
NVIO 6223	F 153	N/A	Laks	S. V Island	N/A	
NVIO 6224	F 162/01	N/A	Regnbueørret	Ø. Island	N/A	
NVIO 6533	990129-1/3B	N/A	Laks	Færøyene	1***	
NVIO 6534	990217-1/1A	N/A	Laks	Færøyene	1***	
NVIO 6539	MT 2528	N/A	Laks	Skottland	1***	
NVIO 6540	MT 2858	N/A	Laks	Skottland	1***	
NVIO 6562		2008	Laks	Møre og Romsdal	1***	
NVIO 6578	Lfi 5006	N/A	Laks	Norge	1****	
NVIO 6834		2009	Torsk	Nordland	N/A	
NVIO 7153		2009	Laks	Møre og Romsdal	0	J1-09
NVIO 7154		2009	Laks	Møre og Romsdal	0	J1-09
NVIO 7192		2010	Laks	Møre og Romsdal	0	J1-09
NVIO 7261		2010	Regnbueørret	Møre og Romsdal	0	G1-10
NVIO 7262		2010	Regnbueørret	Møre og Romsdal	0	G1-10
NVIO 7263		2010	Regnbueørret	Møre og Romsdal	0	G1-10
NVIO 7264		2010	Regnbueørret	Møre og Romsdal	0	G1-10
NVIO 7364		2010	Torsk	Sør-Trøndelag	0	H1-10
NVIO 7365		2010	Torsk	Sør-Trøndelag	0	H1-10
NVIO 7522		2010	Laks	Troms	1	
NVIO 7635		2010	Laks	Sogn og Fjordane	N/A	
NVIO 7693		2010	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 7703		2010	Leppefisk	Hordaland	0	
NVIO 7712		2010	Laks	Nord-Trøndelag	2	
NVIO 7751		2011	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 7752		2011	Laks	Møre og Romsdal	0	
NVIO 7770		2011	Laks	Rogaland	N/A	
NVIO 7780		2011	Laks	Troms	1	
NVIO 7785	Rekultivert NVIO 3632	1996	Laks	Norge	N/A	
NVIO 7787		2011	Laks	Nord-Trøndelag	2	
NVIO 7791		2011	Laks	Møre og Romsdal	N/A	
NVIO 7798		2011	Laks	Troms	1	
NVIO 7804		2011	Laks	Rogaland	1	
NVIO 7806		2011	Laks	Rogaland	0	
NVIO 7813		2011	Regnbueørret	Møre og Romsdal	2	D1-11
NVIO 7815		2011	Regnbueørret	Møre og Romsdal	2	D2-11
NVIO 7817		2011	Torsk	Nordland	1	
NVIO 7819		2011	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 7827		2011	Laks	Nordland	1	
NVIO 7828		2011	Laks	Nordland	1	
NVIO 7839		2011	Laks	Møre og Romsdal	1	
NVIO 7860		2011	Laks	Møre og Romsdal	0	
NVIO 7866		2011	Kveite	Møre og Romsdal	0	
NVIO 5353		N/A	N/A	Canada	N/A	
NVIO 5814	ATCC 15381	1964	Hav	Stillehavet	-	
NVIO 6010	JCM 10249	1995	Hav	Japangropen	-	

* Benediktsdottir et al. (2000)
 ** Bjornsdottir et al. (2011)
 *** D. J. Colquhoun, pers. komm. 21.03.14
 **** Tunsjø et al. (2009)

4.4 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode for eksponentiell oppkopiering av et spesifikt område av DNA *in vitro* ved hjelp av et termostabilt DNA polymerase, to komplementære primere (små oligonukleotider) som flankerer området, og deoksynukleotider (dNTP).

Metodens grunnprinsipper er tre temperatursteg som gjentas i et antall sykluser (20- 30 er vanligvis nok). Flere modifikasjoner til disse stegene er mulige:

Steg 1: Denaturering av DNA ved 94 °C i 1-2 min (kan være lengre ved den første syklusen for å denaturere kromosomalt DNA).

Steg 2: Hybridisering av primere, ca 16- 24 basepar (bp). Temperaturen er avhengig av primeres hybridiseringstemperatur (T_m), men er vanligvis rundt 55 °C, i 1-2 min.

Steg 3: Replikasjon av DNA fra primernes 3`-ende ved 72 °C, der polymerasen bygger DNA som er komplementær til tråden primeren har bundet seg til. Tiden på dette steget er avhengig av enzymets hastighet og lengde på området mellom primerne, vanligvis regnes 1 min / kb som tilstrekkelig (Delidow et al, 1993). For hver syklus vil det optimalt dannes en kopi av hver tråd, som igjen blir templatere til neste syklus, slik at antallet doubles hver gang. Dette begrenses av tilgang til substratene, men 20-30 sykluser kan gi en økning på 10^6 - 10^9 i antall kopier (Madigan, 2005).

4.4.1 Primerdesign

Moritella viscosas typestamme (NCIMB 13548, heretter referert til som «typestamme», eller etter lokalt stammenummer som «NVIO 2033»), ble genomsekvensert av 454 Life Science (www.454.com) ved hjelp av pyrosekvensering (Grove et al., 2008). Metoden baserer seg på produksjon av pyrofosfat ved inkorporering av dNTP under *in vitro* replikasjon av DNA.

Pyrofosfatet blir enzymatisk omgjort til ATP, som er et substrat i en bioluminescensreaksjon som kan måles med en detektor (Nyren, 2007).

Genomsekvenseringen resulterte i et genomutkast («draft») på 5.2 Mb med 1206 kontiger som koder for ca 4800 gener, som ble benyttet videre i studien for identifikasjon av tandemrepererende sekvenser og design av primere. Primere ble designet med programmet primer3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>). Primere ble bestilt fra TAG Copenhagen A/S, Invitrogen, eller Applied Biosystems (ABI). Det er gitt en oversikt over alle primere, inkludert sekvens og hybridiseringstemperatur (T_m), i tabell 1, vedlegg 1.

4.4.2 PCR- amplifikasjon

Om det ikke er angitt modifikasjoner, foregikk PCR-amplifikasjon etter følgende metoder, på enten en PTC-200 eller PTC-220 DYAD Thermal Cycler (MJ Research):

4.4.2.1 PCR-amplifikasjon med DyNAzyme

PCR- amplifikasjon foregikk i 50 µl reaksjoner med 1 µl DyNAzyme™ II DNA Polymerase (2 U/µl, Finnzymes), 5 µl 10X Optimized DyNAzyme Buffer (ved emulsjonsdannelser ble buffer varmebehandlet i 10 min ved 90 °C på varmeblokk), 5 µl 2mM dNTP, 2 µl 20 µM primere, 34 µl miliqvann og 1 µl templat-DNA. PCR- syklus var som følgende: 95 °C i 2 min, deretter 39 sykluser med 94 °C i 1 min, 57 °C i 1 min, og 72 °C i 2 min.

4.4.2.2 PCR- amplifikasjon med TAQ DNA polymerase

PCR- amplifikasjon i 25 µl reaksjoner foregikk med 0,25 µl Taq DNA Polymerase (100 x) (Invitrogen), 2,5 µl 10 x buffer, 2,5 µl dNTP (2 mmol), 0,5 µl av hver primer (20 µM), 0,5 µl templat og 18,75 µl miliqvann. I 50 µl reaksjoner ble det brukt det dobbelte av alle ingrediensene. Innledende denaturering var 95 °C i 3 min, og deretter 30 sykluser med 94 °C, 1 min, 53- 58,5 °C, 1 min, og 72 °C i 3 min.

4.4.3 Multipleks PCR med QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Hotstart)

QIAGEN® Multiplex PCR Kit inneholder en HotStartTaq® DNA Polymerase, som aktiveres ved et steg på 95 °C i 15 min før PCR- syklusene starter. Dette motvirker produksjon av primer-dimerer og uspesifikk hybridisering før og under PCR. Den inneholder også en ”Factor MP”, som skal øke konsentrasjonen av primere rundt templatet, og stabiliserer spesifikke bindinger mellom templat og primer. Bufferen er på forhånd balansert for å gi gode resultater i multipleks PCR- reaksjoner uten behov for optimalisering av ingrediensene (QIAGEN, 2008).

PCR- amplifisering med et QIAGEN® Multiplex PCR Kit (QIAGEN) foregikk i reaksjoner på 25 µl og enkelte ganger i 12,5 µl. Metoden ble endret underveis (årsakene til dette beskrives i kapittel 4.8.7), derfor følger her den innledende metoden, og deretter den endelige metoden. I reaksjonene med 12.5 µl var mengden av komponentene halvert.

4.4.3.1 Innledende metode:

Reaksjonene inneholdt 12,5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, seks eller syv primersett med sluttkonsentrasjon 0,3 µM per primer, 1,5 µl DNA- templat, og resten RNase-fritt vann (følger med settet). PCR- syklus ble initiert med 95 °C i 15 min, deretter 35 sykluser

med 94 °C i 0,5 min, 57 °C i 1,5 min, og 72 °C i 1,5 min, før siste elongeringstrinn på 60 °C i 30 min og deretter 72 °C i 10 min.

4.4.3.2 Endelig metode:

I reaksjonen ble 12,5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2,5 µl 10x primer mix (1 µM av hver primer; sluttkonsentrasjon 0,1 µM), 0,5 µl DNA- templat, og 9,5 µl RNase- fritt vann blandet. PCR- amplifikasjon startet med 95 °C i 15 min, deretter 30 sykluser med 94 °C i 0,5 min, 57 °C i 1,5 min, og 72 °C i 1,5 min. Det siste elongeringstrinnet var ved 60 °C i 60 min.

4.4.4 Agarose Gelelektroforese

Geler ble tillaget med 1, 2 eller 2,5 % Seakem® LE agarose (Lonza) som ble løst opp i 1 X TBE-buffer ved oppvarming i mikrobølgeovn. De ble støpt med 5,5 * 1 -eller 2,5 * 1 mm brønnkammer i 10, 14 eller 15 cm lange gelformer, og 1 X TBE-buffer ble fylt i elektroforesekaret til gelen var dekt med minst 5 mm. Ved bruk av 5,5 * 1 mm brønner, ble 5 µl av produkt applisert brønnene etter å ha blitt blandet med 8 µl 1,625x gelloadingbuffer (6X Orange DNA Loading Dye, Fermentas, #R0631, fortynnet med miliq vann). Det ble brukt 5 µl molekylvektmarkør (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, SM1133, Fermentas, eller SmartLadder MW-1700-10, Eurogentec). Ved støping av 2,5 * 1 mm brønner ble det applisert 3 µl produkt med 5 µl fortynnet gelloadingbuffer, og 3 µl markør. Separasjon av amplifikasjonsprodukt foregikk med forskjellige spenninger og tider, som blir beskrevet under. Geler ble farget i 5 min med etidiumbromid, avfarget med kaldt springvann i 30 min, og deretter og avbildet under UV-belysning med et Epson photo PC 3100Z digitalkamera. Alternativt ble gelen tilsatt 0,1 µl gelfarge (GelRED™ Nucleic Acid Gel Stain, 10000X) per ml før støping, og avbildet med Bio-RADs ChemiDoc™ XRS+ System.

4.4.5 Separasjon og deteksjon av PCR- produkt med kapillærelektroforese

Kapillærelektroforese er en elektroforetisk teknikk som brukes til å separere molekyler etter ladning og størrelse gjennom tynne rør, der den indre diameteren vanligvis er 20–100 µm, og lengden 20–100 cm. Elektrisk spenning får negativt ladet DNA til å migrere mot den positive polen. På grunn av den konstante ladnings/masse-ratioen i DNA brukes en polymer i

kapillærene ved kapillærelektroforese, som gjør at små molekyler migrerer raskere enn de lengre molekylene. Dette kalles «siling» (sieving). Ved å bruke forskjellige fluorescensmerkede primere kan flere PCR-produkter analyseres samtidig i én kapillær, og detekteres med svært høy sensitivitet gjennom laserindusert fluorescens (LIF, Schwartz og Guttman, 1995).

Multipleks PCR-produkt (QIAGEN, innledende metode, kapittel 4.4.4.1) der én primer per lokus var merket med fluorescerende prober på 5-enden ble fortynnet mellom 1:35 og 1:300 i miliqvann, før videre analyse. Sammen med 10 µl formamid, 1 µl Geneflo™ 625 Size Standard, TAMRA-Labeled (Chimerx), ble 1 µl fortynnet produkt applisert en 96-brønns prøveplate. Platen ble forseglet med termofilm og denaturert på en PTC-200 DYAD PCR-blokk (MJ Research) ved 95 °C i 2 min før nedkjøling til 4 °C.

Deretter ble prøvene analysert ved kapillærelektroforese på en 3130 xl Genetic Analyzer (ABI), med følgende innstillinger: injeksjonsspenning: 15kV i 5 s, og kjørespenning: 15 kV (som beskrevet i Lindstedt et al., 2007). Kromatogrammene ble eksportert til og analysert med programvaren GeneMapper v. 3,7 (ABI). De observerte fragmentstørrelsene ble så eksportert til Microsoft Excel-ark.

4.5 DNA-sekvensering

4.5.1 DNA – sekvensering med Sangermetoden

Sangermetoden for sekvensering av DNA baserer seg på en blanding av deoksynukleotider (dNTP; dATP, dTTP, dCTP og dGTP) dideoksynukleotider (ddNTP; ddATP, ddTTP, ddCTP og ddGTP) ved *in vitro* kopiering av DNA. Fire reaksjoner med dNTP-er og hver av de forskjellige ddNTP-ene gir en basespesifikk stopp i polymeriseringen på grunn av den manglende 3`-OH-gruppen på ddNTP. OH- gruppen er en forutsetning for DNA polymerases elongering av tråden, og resultatet blir et fragment for hver posisjon en spesifikk ddNTP inkorporeres. Sekvensen kan så deduseres ved å separere produktene i en gel (Sanger et al., 1977). I en modifisert variant av Sangersekvensering er de fire forskjellige ddNTP-ene merket med hver sin fluorescens- farge som kan analyseres automatisk med kapillærelektroforese (Madigan, 2005).

4.5.2 PCR-Amplifikasjon

Amplifikasjon av DNA foregikk etter metodene for PCR med TAQ eller DyNAzyme polymeraser (kap 4.4.2.1), og produktet ble separert og visualisert på en 1 eller 2 % agarosegel (kap 4.4.4). Lysstyrken på båndene ble sammenliknet med lysstyrken på båndene i DNA- markøren for å anslå mengde DNA i prøvene.

4.5.3 Rensing av PCR-produkt

4.5.3.1 Rensing av PCR-produkt med EXOsap-IT[®]

Etter PCR ble ubrukte primere og nukleotider fjernet ved å inkubere 7 eller 5 µl PCR-produkt med 2 µl EXOsap-IT[®] (USB) på PCR- blokk ved 37 °C i 15 min, og deretter inaktivering ved 80 °C i 15 min. Prøvene ble brukt videre med en gang eller oppbevart ved -20 °C.

4.5.3.2 Kolonnerensing av PCR-produkt med NucleoSpin[®] Extract II Kit

Amplifikasjonsprodukt ble alternativt rensset med et NucleoSpin[®] Extract II Kit (Clontech Laboratories, Inc). Produktet (50 µl) ble blandet med bindingsbuffer (buffer NT) i volumforhold 1:2 (produkt: buffer). Blandingen ble applisert en silicakolonne (Extract II column) som ble satt i et 2 mL samlerør og sentrifugert i 1 min ved 11000 rcf. Væsken i samlerøret ble fjernet og kolonnen satt tilbake, før den ble tilsatt 600 µl vaskebuffer og sentrifugert 1 min ved 11000 g. Væsken ble fjernet igjen og kolonnen tørket ved å sentrifugere i 2 min ved 11000 g. Deretter ble kolonnen satt i et rent 1,5 µl eppendorfrør uten kork. Mellom 30 og 50 µl elueringsbuffer (buffer NE) ble tilsatt, avhengig av båndstyrke i agarosegel, inkubert i 1 min og sentrifugert i 1 min ved 11000 g. Rensset PCR-produkt ble lagret ved - 20 °C eller brukt videre med en gang.

4.5.4 DNA- sekvensering med MegaBACE 1000

4.5.4.1 Syklussekvensering med DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit.

Mellom 1 og 5 µL (avhengig av båndstyrke på agarosegel) av rensset amplifisert DNA, 1 µl primer (enten fwd eller rev primer, 2 µM), og 4 µl reaksjonsmix (*DYEnamic*[™] ET terminator reagent premix for MegaBACE[™], Amersham) ble blandet i PCR- rør. Miliqvann ble tilsatt til

10 µL, og rørene satt på en PCR- blokk innstilt på 30 temperatursykluser, med 95 °C i 20 s, 50 °C i 15 s, 60 °C i 1 min, og deretter kjøling ved 4 °C.

Prøvene ble tilsatt 10 µl Miliqvann. Deretter ble de rensert i en Sephadex™ G-50 kolonne (GE Healthcare), og analysert ved MolekylærBiologisk Enhet (MBE) ved NVIO, med et MegaBACE 1000™ automatisk sekvenseringssystem (Amersham).

4.5.5 DNA- sekvensering med 3130XL Genetic Analyzer

4.5.5.1 Syklussekvensering med BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI).

Sekvenseringsreaksjonen foregikk i reaksjoner på 10 µl med 2,5 µl av én primer (2,0 µM), 2 µl rensert PCR- produkt, 0,5 µl BigDye Terminator 3.1, 2 µl BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X), og 4 µl miliqvann. De ble satt på PCR-blokk med programmet som er gitt i tabell 3.

Tabell 3. Temperatursyklus med med BigDye Terminator sekvensering.

Steg	Temp (°C)/aksjon	Tid/syklus	Steg	Temp (°C)/aksjon	Tid/syklus
1	96	1 min	8	60	1 min 30 sek
2	96	10 sek	9	Gå til 6	4 ganger
3	50	5 sek	10	96	10 sek
4	60	1min 15 sek	11	50	5 sek
5	Gå til 2	14 ganger	12	60	2 min
6	96	10 sek	13	Gå til 10	4 ganger
7	50	5 sek	14	4	∞

4.5.5.2 Rensing av sekvenseringsprøver med BigDye XTerminator® Purification Kit.

Prøvene fra sekvenseringsreaksjonen ble rensert med et BigDye-X-Terminator Purification Kit i en 96- brønns plate. Etter tilsetning av 10 µL XTerminator™ Solution og 45 µL SAM™ Solution, ble platen ristet i 30 min på 2000 rpm med en IKA MS 3 Digital rister.

4.5.6 Separasjon av prøver med kapillærelektroforese

Prøveplaten ble så spunnet ned ved 1000 g i 2 min og analysert på en 3130 xl Genetic Analyzer (ABI) etter metode for mellomstore fragmenter med POP7 polymer (ABI, 2009).

4.5.7 Analyse av sekvenser

Sekvenskromatogrammene ble manuelt korrigert og sammenstilt i programvaren ContigExpress (komponent av Vector Advance NTI v10.0.1, Invitrogen) eller Sequencher v.4,5 (Gene Codes Corporation), og konsensussekvenser (overenstemmelse mellom pluss og minus DNA-tråd) ble eksportert til tekstfiler. Til visualisering av DNA-sekvenser ble programvaren Geneious v7.1.7 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) brukt.

4.6 Sekvensering av *gyrB* -genet

DNA gyrase, en type II topoisomerase, er et enzym som lager negative supercoiler på DNA i bakterier (Gellert et al. 1976). Underenhet B i proteinet kodes av genet *gyrB*, og proteinet er uunnværlig under replikasjon av DNA. Sekvensanalyse av dette genet er foretatt i flere studier av forskjellige bakterier, og passer for analyse av fylogeni på artsnivå (Wang et al., 2007). Det følgende var en del av sekvenseringsprosjektet beskrevet i studien av Grove et al., (2010), der deler av genet *gyrB* ble sekvensert i 40 stammer av *M. viscosa*, i tillegg til *M. marina* og *M. japonica*.

4.6.1 Primerdesign

For å finne konserverte områder i genet ble *gyrB* -gensekvensen fra *M. viscosa* tpestamme (tilgangsnummer GenBank: GU124774) og et isolat fra regnbueørret der genet allerede var sekvensert, stammenummer NVIO 5450 (tilgangsnummer: GU124777), sammenstilt med det samme genet fra isolatet *Moritella sp. PE36* (tilgangsnummer: ABCQ01000076, locus tag: pe36_15395) med programmet ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

Det ble designet syv primere i de konserverte områdene av deler av genet, ved hjelp av programmet primer3, v.0.4.0. To av disse ble så modifisert med degenererte baser⁴. To primere (MvGyrBF og- R) var allerede tilgjengelig ved NVIO da forsøket startet. Samtlige primere er gitt i tabell 4.

⁴ Degenererte baser, slingringer (eng. wobbles), kan benyttes hvis området primeren skal binde inneholder polymorfismer, f.eks om stedet har både en C og en T i sekvenser fra forskjellige isolater. Begge variantene av primere blir da produsert.

Tabell 4. Liste over primere til sekvensering av genen *gyrB*. (se tabell 1, vedlegg 1 for sekvenser og T_m).

Primernavn	Sekvens (5' - 3')	T _m (°C)
<i>MvGyrBF</i>	TGGCGCAGTATCTGATTGAG	59,97
<i>MvGyrBR</i>	GCAACCGCTTAATCATAGCC	59,71
<i>MoritellaGyrB1_L</i>	TGTCTGAAAATAATTACGACTCTTCAA	59,66
<i>MoritellaGyrB1_R</i>	CACCWACACCGTGTAACCA	A=60,32 T=56,96
<i>MoritellaGyrB2_L</i>	CGGTGTWGGTGTCTGTTG	A=56,67 T=60,04
<i>MoritellaGyrB2_R</i>	AAACCATCGTTCCTGCAT	60,38
<i>MoritellaGyrB3_L</i>	GGAACGATGGTTTCCAAGAA	59,91
<i>MoritellaGyrB3_R</i>	CAGCAGAGTCACCTTCCACA	60,02
<i>MoritellaGyrB1_L#2</i>	AAGCATTAGCGGGTCATTGT	59,6
W=A/T		

PCR- oppsettet med DyNAzyme eller TaqTM DNA polymerase er beskrevet i kap 4.4.2, hybridiseringstemperatur varierte mellom 53 og 58,5 °C. Med primerne *MoritellaGyrB1_L* eller *1_L#2*, og *MoritellaGyrB3_R* eller *2_R* ble en sekvens på ca 1150 eller 650 baser amplifisert. Etter separasjon med elektroforese ved 2,3 V/cm i en time⁵ på en 1 % agarosegel med Smartladder som markør ble produktene visualisert og tatt bilde av under UV-belysning. Produktet ble rensset med kolonner eller EXOsap-IT som beskrevet i kap 4.5.3.1. Med unntak av primer *MoritellaGyrB1_L* ble alle primere i tabell 5 brukt til sekvenseringsreaksjonen. Prøvene ble rensset, og sekvensanalysen foregikk på en MegaBACE 1000 som beskrevet i kapittel 4.5.1.

Tabell 5. Stammer til sekvensering av genen *gyrB*.

Stammenummer	Bakterieart	Stammenummer	Bakterieart
NVIO 4731	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6219	<i>Moritella viscosa</i>
NVIO 4917	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6220	<i>Moritella viscosa</i>
NVIO 4958	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6221	<i>Moritella viscosa</i>
NVIO 5168	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6222	<i>Moritella viscosa</i>
NVIO 5433	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6223	<i>Moritella viscosa</i>
NVIO 5443	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6224	<i>Moritella viscosa</i>
NVIO 5507	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 5814	<i>Moritella marina</i>
NVIO 6216	<i>Moritella viscosa</i>	NVIO 6010	<i>Moritella japonica</i>

4.6.2 Analyse av *gyrB* DNA-sekvenser

Etter sammenstilling og korrigeringsprogrammet ContigExpress (kapittel 4.5.7), ble sekvenser og rådata (kromatogrammer) inkludert som en del av sekvenseringsprosjektet

⁵ I en av gelene ble polene på elektroforesekarret byttet om, så separasjonen ble avsluttet etter 15 min.

beskrevet av Grove et al. (2010). Sekvensene fra prosjektet ble lastet opp i Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) med tilgangsnummer GU124771–GU124812. Dette er 42 sekvenser fra 40 *M. viscosa*-stammer, samt *M. marina* og *M. japonica*, som er gitt i tabell 6. En del av genet på 926 bp som var inkludert i alle disse sekvensene, ble analysert med «Maximum Likelihood»-algoritmen i programmet PhyML v 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>, 06.06.14, Guindon et al., 2010) med standard innstillinger, og evaluert med 1000 «bootstraps» (tilfeldige retester med tilbakelegging). Dendrogrammet ble visualisert i programmet MEGA v.6.06 (tilgjengelig fra: <http://www.megasoftware.net>, Tamura et al., 2013).

Tabell 6. Bakteriestammer der 926 bp av *gyrB*-genet ble analysert.

<i>Moritella viscosa</i> - stammer							
Stamnummer	År	Fiskeart	Geografisk opphav	Stamnummer	År	Fiskeart	Geografisk opphav
NVIO 1527	1990	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 5450	2006	Regnbueørret	Møre og Romsdal
NVIO 2033	1988	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 5471	2006	Torsk	Sør-Trøndelag
NVIO 2989	1995	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 5482	2006	Torsk	Møre og Romsdal
NVIO 3968	1999	Regnbueørret	Møre og Romsdal	NVIO 5507	2006	Torsk	Nordland
NVIO 3999	1999	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 5683	2007	Regnbueørret	Hordaland
NVIO 4179	2000	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 6184	2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal
NVIO 4397	2001	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 6185	2008	Regnbueørret	Møre og Romsdal
NVIO 4547	2002	Torsk	Hordaland	NVIO 6216	2008	Laks	Møre og Romsdal
NVIO 4679	2003	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 6219	N/A	Laks	S. V. Island
NVIO 4692	2003	Regnbueørret	Møre og Romsdal	NVIO 6220	N/A	Laks	N. Island
NVIO 4731	2003	Laks	Møre og Romsdal	NVIO 6221	N/A	Laks	S. V. Island
NVIO 4869	2004	Regnbueørret	Sør-Trøndelag	NVIO 6222	N/A	Rognkjeks	S. V. Island
NVIO 4917	2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	NVIO 6223	N/A	Laks	S. V. Island
NVIO 4958	2004	Regnbueørret	Møre og Romsdal	NVIO 6224	N/A	Regnbueørret	Ø. Island
NVIO 5168	2005	Regnbueørret	Møre og Romsdal	NVIO 6533	N/A	Laks	Færøyene
NVIO 5204	2005	Torsk	Nord-Trøndelag	NVIO 6534	N/A	Laks	Færøyene
NVIO 5351	N/A	Laks	Canada	NVIO 6539	N/A	Laks	Skottland
NVIO 5352	N/A	Laks	Canada	NVIO 6540	N/A	Laks	Skottland
NVIO 5433	2006	Laks	Nordland	NVIO 6562	2008	Laks	Møre og Romsdal
NVIO 5443	2006	Laks	Vest-Agder	NVIO 6578	N/A	Laks	Norge
Referansestammer fra genus <i>Moritella</i>							
Stamnummer	År	Bakterieart	Geografisk opphav	Stamnummer	År	Bakterieart	Geografisk opphav
NVIO 5814	1964	<i>M. marina</i>	Stillehavet	NVIO 6010	1995	<i>M. japonica</i>	Japangropen

4.7 Utvikling av og analyse med Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

4.7.1 Primerdesign

Da dette arbeidet startet var det ved NVIO allerede, ved hjelp av programmet Tandem Repeats Finder v. 4.00 (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), blitt identifisert 31 tandemrepetisjoner i genomkastet, med repeterende enheter mellom 5 og 18 bp, og antall repetisjoner fra 4 til 24. All navngivning av TR- loki og primere baseres på resultatet av dette, og kommer i kronologisk rekkefølge fra tekstfilen som ble generert av programmet (VNTR+nr). Det var også blitt designet primersett til amplifikasjon av de 20 første tandemrepeterende (TR) loki i denne tekstfilen med programmet primer3 v.0.4.0. Videre ble det designet flere primere med samme program, både til undersøkelse av nye loki, og til multipleks PCR. For multipleks PCR ble primere designet med et spenn i forventet produktstørrelse i tpestammen, fra ca 100 til 700 bp, med den hensikt å unngå overlapp eller tvetydigheter ved analyse av resultater i en multipleks PCR. Hybridiseringstemperaturen ble her begrenset til mellom 59 og 61 °C (T_m; Breslauer et al., 1986).

4.7.2 Utvikling av MLVA for agarose gelelektroforese

4.7.3 Identifisering VNTR- loki

For å undersøke primernes effektivitet og forekomst av variasjon i de 20 første TR- loki, ble det foretatt PCR- amplifikasjon med DyNAzyme (kapittel 4.4.2.1), med DNA- templat fra 12 stammer av *M. viscosa* fra forskjellige fiskearter, sted, og år, samt *M. marina* (NCIMB 1144) og *M. japonica*⁶ (JCM 10249). Oversikt over disse stammene er gitt i tabell 7, og primere er gitt i tabell 1 i vedlegg 1 som *M.viscosa_VNTR_1_L* til *20_L*, og *1_L* til *20_R* (primere som ender med «#2» til «#5» ble designet senere). Produktet ble separert i 1 eller 2 % agarose gel (4.4.4). De første to gelene var 1 %, og ble DNA ble separert med hhv 2,5 V/cm i 1,25 timer, og 0,8 V/cm i 4 timer. Videre var det kun geler med 2 % agarose for å øke oppløsningen, og PCR-produkt ble separert ved 1,7 V/cm i 4 eller 3,5 timer, og senere 3,3 V/cm i 1,5 timer. Det ble brukt O`genruler 50 (Fermentas) som DNA- markør.

⁶ Ble introdusert ved test av VNTR 13- lokuset.

Tabell 7. Stammer for PCR-amplifikasjon av VNTR-loki.

Stammenummer	Bakterieart	Fiskeart
NVIO 2033	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 3999	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 4179	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 4731	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 4917	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 4958	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5168	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5433	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 5443	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 5450	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5507	<i>Moritella viscosa</i>	Torsk
NVIO 5683	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5814	<i>Moritella marina</i>	-
NVIO 6010	<i>Moritella japonica</i>	-

4.7.4 Multipleks PCR- amplifikasjon av VNTR loki og separasjon med agarose gel elektroforese

Det ble satt opp flere PCR- reaksjoner, der primere ble testet i par, og/eller i multipleksreaksjoner med seks eller sju primersett med DNA fra forskjellige stammer av *M. viscosa*, og enkelte ganger *M. marina* og *M. japonica*. Innledningsvis med DyNAzyme (kapittel 4.4.2.1) og senere med et QIAGEN Multiplex PCR- kit (kapittel 4.4.3.1). Separasjon av PCR- produktene foregikk på 2 og 2,5 % agarosegeler (kap 4.4.4), med O`genruler 50 som markør. En oppsummering av disse forsøkene, inkludert resultater, er gitt i vedlegg 2, tabell 1 til 12. Tabell 8 under viser siste kombinasjonen av primere og primerkombinasjonen som ble brukt. Disse var tiltenkt å brukes til analyse av flere bakteriestammer.

Tabell 8. Den siste kombinasjonen av primere til multipleks PCR, for separasjon med agarose gel elektroforese hybridiseringstemperatur og sekvens er gitt i tabell 1, vedlegg 1.

Fwd primer	Rev primer	Forventet produkt-størrelse typestamme (bp)
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	136
<i>M.viscosa_VNTR_6_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#3</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	272
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608

4.7.5 Konvertering til MLVA for kapillærelektroforese fra agarose gelelektroforese.

4.7.5.1 Identifisering nye VNTR- loki

Metoden ble endret slik at separasjon av PCR-produktet skulle foregå ved hjelp av kapillærelektroforese. Det medførte enkelte endringer i PCR-oppsettet og primervalg. Det ble designet enkelte nye primere, med programmet primer3 v.0.4.0, på bakgrunn av resultater fra gel- metoden, og for å tilpasse størrelsen av fragmentene til molekylvektmarkøren som ble brukt under analysering med kapillærelektroforese, Geneflo™ 625 (50-625 bp). Tabell 9 gir forventet fragmentstørrelser med nye primere.

Tabell 9. Nye primere (i fet skrift), og forventet produktstørrelse i tpestamme (tabell 1, vedlegg 1 for sekvenser og Tm).

Fwd primer	Rev primer	Forventet produkt-størrelse tpestamme (bp)
<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>	438
<i>M.viscosa_VNTR_27_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R#2</i>	451
<i>M.viscosa_VNTR_25_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_25_R</i>	446
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#3</i>	510
<i>M.viscosa_VNTR_15_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R</i>	515
<i>M.viscosa_VNTR_6_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186
<i>M.viscosa_VNTR_28_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_28_R</i>	568
<i>M.viscosa_VNTR_21_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_21_R</i>	118

Primerne ble først testet i par som i kapittel 4.4.2.1 (Dynazyme), men med templat fra kun to stammer; NVIO 2033 og NVIO 6184, og separert ved 3,3V/cm, i 1 time på en 2 % agarose gel. Deretter ble det valgt ut to nye primerpar (i tillegg til *M.viscosa_VNTR_6_L#2* og *M.viscosa_VNTR_15_L#2*, jfr tabell 9) til en multipleks PCR- reaksjon (kapittel 4.4.4.3) med seks loki (tabell 10) for å vurdere de nye områdene. Det ble brukt templat fra de 12 *M. viscosa*- stammene i Tabell 7, og prøvene ble separert på en 2,5 % agarosegel ved 4 V/cm i 3 timer.

Tabell 10. Primere til multipleks analyse av seks TR-loki (tabell 1, vedlegg 1 for sekvenser og Tm).

Fwd primer	Rev primer	Forventet produkt-størrelse tpestamme (bp)
<i>M.viscosa_VNTR_21_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_21_R</i>	118
<i>M.viscosa_VNTR_6_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#3</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	268
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354
<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>	438
<i>M.viscosa_VNTR_15_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R</i>	515

4.7.6 Analyse med kapillærelektroforese

Det ble bestilt seks primere med fluorescerende prober på 5- enden fra ABI (rev primere i tabell 10) som ble byttet ut med tilsvarende primere gitt i tabell 11. I tillegg ble en primer redesignet ved å fjerne en tymin (T) i 5'-enden slik at Tm på alle primere ble mellom 59 og 61 °C (*M.viscosa_VNTR_6_L#3*).

Tabell 11. Primere til analyse av VNTR-loki med kapillærelektroforese, nye primere er fluorescensmerket (tabell 1, vedlegg 1 for sekvenser og Tm).

Fwd primer	Rev primer (fluorescensmerket)	Forventet produktstørrelse tpestamme (bp)	Repeterende enhet (bp)	Antall repetisjoner
<i>M.viscosa_VNTR_21_L</i>	FAM-MoritellaVNTR21_R	118	9	5
<i>M.viscosa_VNTR_6_L#3</i>	VIC-Moritella_VNTR_6_R	185	6	5
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#3</i>	NED-Moritella_VNTR_20_R	268	6	7
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	FAM-Moritella_VNTR_14_R#2	354	5	13
<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	VIC-Moritella_VNTR_27R	438	6	5
<i>M.viscosa_VNTR_15_L#2</i>	NED-Moritella_VNTR_15_R	515	9	8

Innledningsvis ble åtte stammer (tabell 12) amplifisert med et QIAGEN multipleks PCR-kit etter den «innledende» metoden beskrevet i kapittel 4.4.3.1 og analysert med kapillærelektroforese som i kap 4.4.5. Alle PCR- produktene ble fortyntet i en fortynningsrekke før videre analyse med kapillærelektroforese. De første fire prøvene ble fortyntet med 1 µl produkt i 100, 200, 250 og 300 µl miliqvann. De neste fire prøvene ble fortyntet med 1 µl produkt i 150 µl og 200, 250 og 300 µl miliqvann. Senere ble det brukt andre fortyninger som spesifiseres under.

Tabell 12. De første 8 prøvene til analyse med kapillærelektroforese.

Stammenummer, første 4 prøver	Stammenummer, prøve 5 -8
NVIO 2033	NVIO 3999
NVIO 4917	NVIO 4731
NVIO 4958	NVIO 5433
NVIO 5450	NVIO 5507

4.7.7 Optimalisering av PCR- oppsett

Det ble foretatt forskjellige justeringer av PCR-metoden grunnet «splittopper» med ett basepar forskjell, og til dels stor variasjon mellom topphøyde i flere av kromatogrammene. Spesielt var signalene fra fragmentet VNTR 15 svake. Metoden var ellers lik «innledende metode», kapittel 4.4.3.1. Analyse av prøver med kapillærelektroforese, kap 4.4.5, forble uendret. I de tre første forsøkene ble det benyttet DNA isolert fra to av stammene, NVIO 2033 og NVIO 4731, og i disse ble det parallelt også foretatt PCR med «innledende metoden»:

Touchdown PCR er en metode for å hindre uspesifikk hybridisering av primere, ved å starte med en høyere hybridiseringstemperatur, som så gradvis går ned for hver syklus til den når ønsket temperatur, for deretter å bli værende på denne temperaturen de resterende syklusene (Don et al., 1991). Harth-Chu et al. (2009) benyttet denne metoden i en multipleks VNTR-analyse for kapillærelektroforese av den matbårne bakterien *Vibrio parahaemolyticus*, for å forsøke å omgå problemer med uventede topper i kromatogrammet.

Hybridiseringstemperaturen ble senket 0,2 °C for hvert steg, i 20 sykluser inntil den regulære temperaturen ble nådd, noe som forbedret resultatet signifikant.

4.7.7.1 “Touchdown” PCR

Touchdown PCR foregikk med et QIAGEN multiplex PCR-kit. Metoden er som innledende metode, men med reduksjon i hybridiseringstemperatur med 0,2 °C per steg i de 20 første syklusene, fra 61- 57 °C, og de siste 15 sykluser ved 57 °C. Dette ble gjort både med normal og halvert konsentrasjon av primere, men VNTR 15- primere hadde uendret konsentrasjon. Disse prøvene ble fortynnet med 1 µl PCR-produkt i 100, 150, 200 og 250 µl miliqvann før analyse med.

4.7.7.2 Redusering av hybridiseringstemperatur og test av alternativ primer

Hybridiseringstemperaturen ble endret til 55 °C, og konsentrasjoner av primere var som overfor. For lokuset «VNTR 6» (som hadde splittopper) ble den ene primeren byttet til den opprinnelige primeren (*M.viscosa_VNTR_6_L*, tabell 1, vedlegg 1) Hensikten med dette var å se om lavere T_m ville gi bedre amplifisering av VNTR 15- lokuset, og om den andre primeren ikke gav splittopper. Prøvene ble fortynnet med 1 µl i 100 og 200 µl miliqvann.

4.7.7.3 Reduksjon av templat, primer og endring av PCR-syklus

Taq DNA polymeraser fester ekstra adenosinbase (A) som på 3'-enden av de fleste PCR-produkter, og når denne prosessen er ufullstendig, oppstår ofte såkalte N-1 topper, der en dobbelttopp har ett basepar i avstand (splittopp). Dette skjer ofte når det er store mengder PCR-produkter, og det siste steget i syklusen ved 60 °C i 30 min har som hensikt å fullføre denne prosessen. Slike splittopper bedres ved å redusere antall PCR-sykluser og mengde templat (QIAGEN, 2008). Problemer med splittopper har også blitt effektivt forbedret ved å øke siste elongeringssteg ved 60 °C, i et tilfelle der problemet var forårsaket av lav pH (ABI, 2008).

Mengde templat ble redusert til 0,5 µl, og primerkonsentrasjon ble redusert til 0,1 µM. En kombinasjon av de to ovenfor, der det var både «innledende» (0,3 µM) og lavere (0,1 µM) konsentrasjon av VNTR 15- primere ble også testet. Prøvene ble satt på PCR blokk både med den opprinnelige metoden, og på et program der antall sykluser ble redusert til 30 og det siste elongeringssteget ved 60 °C ble forlenget fra 30 til 60 min. Fortynning i disse prøvene var 1 µl produkt + 75 µl miliqvann.

4.7.7.4 Endring PCR- syklus

Det ble oppdaget at det siste steget i PCR-syklusen, 72 °C i 10 min, ikke er etter produsentens QIAGEN anbefalinger (programmet for VNTR som ble brukt var allerede innstilt på PCR-blokkene). Så det ble forsøkt å fjerne dette for å se om det hadde noen innvirkning på resultatene.

Endringer som ble beholdt videre fra forsøkene ovenfor var: halvering av templatmengde, reduksjon av primerkonsentrasjon, reduksjon av antall sykluser og forlenging av siste

elongeringssteg. Åtte stammer ble analysert med disse endringene, samtidig med at 8 andre stammer ble analysert etter i tillegg å fjerne det siste steget. Fortynning av PCR-produktet var 1 µl produkt + 75 µl miliqvann.

4.7.7.5 Gradient -PCR

For å undersøke om en høyere hybridiseringstemperatur kunne forbedre resultatene, ble det foretatt en gradient-PCR, det vil si PCR ved flere forskjellige temperaturer, men ellers under like forhold. Justeringen over ble også beholdt, og med stammene NVIO 2033 og NVIO 4731 ble det foretatt PCR samtidig med fire forskjellige hybridiseringstemperaturer: - 57,2 - 58 - 59,2 - 60 °C. Fortynning var 1 µl produkt + 75 µl miliqvann.

Hybridiseringstemperaturen på 57 °C ble beholdt.

4.7.8 Analyse av MLVA med kapillærelektroforese

Resten av stammene (tabell 2), i tillegg til enkelte prøver som måtte analyseres på nytt, ble amplifisert i multipleks PCR- reaksjoner med den «endelige» metoden i kapittel 4.4.2.2, med primerne i tabell 11. Prøvene ble analysert på kapillærelektroforese som beskrevet i kapittel 4.4.5. Fortynning av prøvene var for det meste 1+75 (produkt + miliqvann), og det ble foretatt noen reanalyser der ble prøvene fortynnet annerledes (1 + 35, 1 + 40, 1 + 50 og 1 + 100).

4.7.10 Verifikasjon ved DNA-sekvensering

Minst en variant av hver fragmentstørrelse som ble observert i kapillærkromatogrammene ble valgt ut til sekvensering for å observere om variasjon kom av forskjeller i antallet repeterende enheter. Syv nye primere ble designet til sekvensering, mens resten av primerne var primere tidligere designet til utvikling av VNTR- analysen. Tabell 2 i vedlegg 1 gir oversikt over stammer, og hvilke loki som ble sekvensert.

Tabell 13 primere brukt til sekvensering (se tabell 1, vedlegg 1 for sekvenser og Tm).

Fwd primer	Rev primer
<i>M.viscosa_VNTR_6 seq_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>
<i>M.viscosa_VNTR_14 seq_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R</i>
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_seq_R</i>
<i>M.viscosa_VNTR_20_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>
<i>M.viscosa_VNTR_21_seq_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_21_seq_R</i>
<i>M.viscosa_VNTR_27_seq_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_seq_R</i>

Sekvensering av VNTR-loki foregikk som beskrevet i kapittel 4.4.2.1 og 4.5.5.

Kromatogrammene ble sammenstilt ved hjelp av programmet Sequencher v. 4,5.

4.7.11 Spesifikk PCR for sammensatt repetisjon

Sammensatte repetisjoner (eng: compound repeats) består av to eller flere tandem repetisjoner med ulike repetisjonsmotiver der avstanden mellom disse er kort. En definisjon av denne avstanden ble ikke funnet i litteraturen, men i tre analyser av slike repetisjoner ble maks avstand i søkene som ble foretatt satt til 10 bp eller kortere (Kofler et al., 2008, Chen et al., 2011, Chen et al., 2012).

Det ble designet to primere for spesifikt å kunne binde seg til, og på den måten identifisere en sammensatt repetisjon, en «ekstra» repetisjon (2*30bp) ved siden av repetisjonen i lokuset VNTR 27, som ble identifisert i kun enkelte av stammene. Primerne er gitt i tabell 14, bindingssteder er gitt i figur 6. Hybridiseringstemperaturen ble beregnet med programmet primer3 v.0.4.0.

Tabell 14. Navn, sekvens og Tm på primere til spesifikk binding i repetisjon av en sekvens på 30 nukleotider (nt).

Primernavn	Sekvens (5'-3')	Tm (°C, Breslauer et al 1986)	Leverandør
<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#1</i>	TCTCGAAAGCAAACCAGTTG	60,41	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#2</i>	TTGTTGCCAAAGTCTCGAAAG	60,41	Invitrogen

<p><i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#1</i> 5'.....GTTTTG-GTTTTG-GTTTTG-GTTTTG-GTTTTG-A- TTTCGAGACTTTGGCAACA<u>CAACTGGTTTTGC</u>-TTTCGAGACTTTGGCAACA<u>CAACTGGTTTTGC</u>- TTTCAGTGGTGC.....3'</p>
<p><i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#2</i> 5'.....GTTTTG-GTTTTG-GTTTTG-GTTTTG-GTTTTG-A- TTTCGAGACTTTGGCAACA<u>CAACTGGTTTTGC</u>-TTTCGAGACTTTGGCAACA<u>CAACTGGTTTTGC</u>- TTTCAGTGGTGC.....3'</p>

Figur 6. Øverste linje i hver delfigur: primernavn. Linje 2: repetisjon med lengde seks pb, ble funnet i alle stammer der lokuset ble sekvensert. Linje 3: en repetisjon av 30 bp, kun i noen av stammene, inkludert typestamme. Primernes bindingssteder er markert med understrek, og er spesifikke for repetisjonen på 30 bp.

PCR- amplifikasjon foregikk med TAQ DNA polymerase, som i kapittel 4.4.2.2, men hybridiseringstemperatur var 57 grader, og elongeringssteget var 1 min. En stamme med (NVIO 2033), og en stamme uten de «ekstra» 30 bp (NVIO 7263), ble brukt som templat, og prøvene ble separert på en 2 % agarosegel ved 8 V/cm i 1 time (tabell 15).

Tabell 15. DNA-templat og primere brukt i forsøket, og applisering av prøver i agarosegel.

Brønnummer	Stammenummer/ markør	Fwd primer	Rev primer	Ekstra rev primer
1	O'GeneRuler 50 bp			
2	NVIO 2033	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>	
3	NVIO 2033	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#1</i>	
4	NVIO 2033	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#2</i>	
5	NVIO 2033	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#1</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>
6	NVIO 2033	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>
7	NVIO 7263	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>	
8	NVIO 7263	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#1</i>	
9	NVIO 7263	<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#2</i>	
10	O'GeneRuler 50 bp			

4.7.12 Beregning av antall repetisjoner

Antall repeterende enheter i sekvensdata ble telt manuelt i et tekstbehandlingsprogram (ConTEXT, www.contexteditor.org) og sekvensene fra hvert område ble så sammenstilt med ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) for å se etter ulikheter i flankerende sekvenser.

Reell fragmentstørrelse ble beregnet med formelen:

$$(1) \quad \text{fragmentstørrelse(bp)} = \text{flankerende område (bp)} + \text{reputerende enhet (bp)} * \text{antall observerte kopier}$$

Kapillærens unøyaktighet ble beregnet med formelen:

$$(2) \quad \text{unøyaktighet(bp)} = \text{fragmentstørrelse observert (bp)} - \text{fragmentstørrelse forventet (bp)}$$

For de områdene der unøyaktigheten endret seg avhengig av fragmentstørrelsen ble det generert en lineær formel (lineær regresjon med OpenOffice Calc v. 3,2), $f(x)$, der unøyaktighet ble fremstilt som funksjon av fragmentstørrelsen:

$$(3) \quad \text{unøyaktighet (bp)} = \text{stigningstall} * \text{fragmentstørrelse(bp)} + \text{konstant}$$

Denne formelen ble så brukt for å beregne antall repeterende enheter i hvert locus i alle stammene som ble analysert:

$$(4) \quad \text{antall repetisjoner} = \frac{\text{fragmentstørrelse (bp)} - \text{flankerende område (bp)} - \text{usøyaktighet (bp)}}{\text{lengde på repeterende enhet (bp)}}$$

Isolater med opprinnelse fra det samme anlegget og identiske antall TR -kopier i alle loki, ble ikke inkludert i analysen, slik at det kun var en av hver variant. Ni stammer ble fjernet fra analysen, gitt i tabell 16, og 97 stammer ble beholdt videre i studien. Tabell 3 i vedlegg 1 viser alle stammene, observert fragmentlengde og beregnet repetisjonstall for hvert loki, og stammene som ikke er med i den videre analysen står med understrek.

Tabell 16. Stammer som ikke ble i analysen av data på grunn av identiske VNTR-profiler fra to eller flere isolater fra det samme anlegget.

Anleggskode	Stammenummer
A-02	NVIO 4548
B2-03	NVIO 4744
E-06	NVIO 5474
E-06	NVIO 5475
F1-08	NVIO 6160
J1-09	NVIO 7154
J1-09	NVIO 7192
G1-10	NVIO 7264
H1-10	NVIO 7365

4.7.13 Analyse av data med Bionumeics v. 6,1

Loki som var fraværende i kromatogrammene ble merket N/A. Repetisjonstallet fra hvert lokus (med unntak av VNTR 27) fra 97 stammer, ble sammen med data om opprinnelse (geografisk og eventuelt anlegg der virulensgrad ikke var 0), årstall, vertsfisk, virulens, importert i programmet Bionumerics v. 6.1 (Applied Maths NV, tilgjengelig fra <http://www.applied-maths.com>). I tillegg ble grupperinger etter analyse med *gyrB* gensekvens fra 48 stammer av *M. viscosa* (resultater fra kapittel 4.6), og åtte stammer der det stod informasjon om *gyrB*-gruppering i bakteriedatabasen ved NVIO), importert i programvaren.

Data ble analysert med algoritmene «Minimum Spanning Tree» (MST) og «Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean» (UPGMA) for kategoriske data. Kategoriske data vil si at dataene behandles uavhengige av den numeriske verdien (i dette tilfellet antall

repetisjoner), men som enten like eller ulike. Minimum Spanning Tree er en algoritme som kobler data på en måte slik at den summerte distansen mellom prøvene er lavest mulig. Da det er vanlig at denne algoritmen frembringer flere trær, er det vanlig å sette prioriteringsregler for å redusere antall muligheter (Applied Maths, 2004, van Belkum et al., 2007). Regelen «størst antall enkeltlokusvarianter» (ulikheten mellom stammene er ved kun ett lokus), og deretter «størst antall dobbeltlokusvarianter» ble brukt i analysen av data med MST. Programmet kan produsere oppdelinger som viser nært beslektede grupper (klonale komplekser) etter kriterier for avstanden (ulikheten) mellom prøver. Kriteriene for avstanden ble satt til «maksimal forskjell ved ett lokus», i tillegg til kriteriene «minimum to prøver» og «minimum tre knuter» i en oppdeling.

Det ble også generert et UPGMA-dendrogram, som baseres på middelverdien av parvise sammenlikninger (Applied Maths, 2004).

4.7.14 BLAST-søk

Det ble foretatt et søk med sekvensene fra alle VNTR-loki i genomet i typestammen som var inkludert i studien, inkludert minst 200 bp av flankerende sekvens med BLAST-algoritmen (Basic Local Alignment Search Tool), i databasen ved NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast, 04.04.14).

4.7.9 Beregning av diversitetsindeks og test for rekombinasjon

4.7.9.1 Diversitetsindeks

Det ble kun inkludert en av hver VNTR-type med opprinnelse fra samme anlegg for analyse av diversitetsindeks og koblingsulikevekt. Disse er gitt i tabell 3 i vedlegg 1. Det samme gjelder isolater fra tre settefiskanlegg der det ble observert lik VNTR-type også etter sjøsetting (tabell 17).

Tabell 17. Prøver fra settefiskanlegg som ble utelatt fra analyse av diversitetsindeks og koblingsulikevekt.

Anleggskode	Stammenummer
I1-00	NVIO 4178
B1-03	NVIO 4679
C1-03	NVIO 4711

Evnen en analyse har til å diskriminere mellom prøver kan fremstilles med en diversitetsindeks (DI). Hunter-Gaston indeksen, derivert fra Simpsons diversitetsindeks (Simpson, 1949), gir sannsynligheten for at to tilfeldige prøver i utvalget er ulike, etter formelen:

$$(5) \quad DI = 1 - \frac{\sum_{n_1}^{n_x} n(n-1)}{N(N-1)}$$

Der n er antallet prøver som er av type 1 til x , og N er antallet prøver. DI vil være et tall mellom 0 og 1, med ingen diversitet ved 0 og full diversitet ved 1, det vil si at henholdsvis alle (0) og ingen (1) prøver er av samme type (Hunter og Gaston, 1988 og Gacton).

Hunter-Gaston indeksen for hvert loki, og alle loki kombinert, i 94 isolater, ble beregnet med programmet V-DICE (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>) (05.12.14). I tillegg ble den kombinerte diversitetsindeksen beregnet for isolater kun fra laks og fra isolater som falt i en gruppe som samsvarte med den «typiske» gruppen av *M. viscosa* som er beskrevet av Grove et al. (2010).

4.7.9.2 Koblingsulikevekt

Koblingsulikevekt er assosiasjon av alleler på et eller flere loki, grunnet lav rekombinasjonsrate. Denne forventes å være sterk i klonale organismer, mens den er borte i populasjoner med fri rekombinasjon (Haubold og Hudson, 2000, van Belkum et al., 2007).

Ved hjelp av programmet LIAN v 3.6 (<http://guanine.evolbio.mpg.de/lian/>, 05.12.14), ble forventet varians ved likevekt (V_E), observert varians (V_D) og en standardisert assosiasjonsindeks (I_A^S) beregnet. I_A^S er et mål på kobling, og er null ved koblingslikevekt. Programmet foretar så en test av nullhypotesen om at variansen er som forventet ved likevekt, $H_0: V_D=V_E$. Den finner deretter, gjennom 100 Monte Carlo retestinger, en 5 prosent kritisk verdi for variansen og P-verdien for hypotesetestingen. og finner en 5 prosent kritisk verdi for variansen og P-verdien for hypotesetestingen, gjennom 100 Monte Carlo retestinger.

4.7.10 Stabilitetstesting av VNTR-loki

Bakteriologilaboratoriet gjennomførte 40 omsåinger av to stammer- NVIO 2033 (typestammen) og NVIO 5450 (fra regnbueørret) for å bedømme stabiliteten av tandemrepererende sekvenser. Stammene ble strøket ut fra fryser (-80 °C) som beskrevet i kapittel 4.2, inkubert ved 15 °C i tre døgn, og deretter ble celler fra en koloni strøket ut på en ny skål som ble inkubert i ett døgn (ukedager) eller tre døgn (over helg), til dette var gjort 40 ganger. En koloni fra omsåing nummer 10, 20, 30 og 40 fra ble satt i 1000 µl EasyMAG[®] Lysis Buffer, som ble lagret ved 4 °C. DNA ble deretter isolert ved MBE fra hver 10. utstrykning med DNA- ekstraksjonsapparatet NucliSENS[®] EasyMAG[®]. Prøvene ble så analysert som beskrevet i kapittel 4.4.3.2 og 4.4.5.

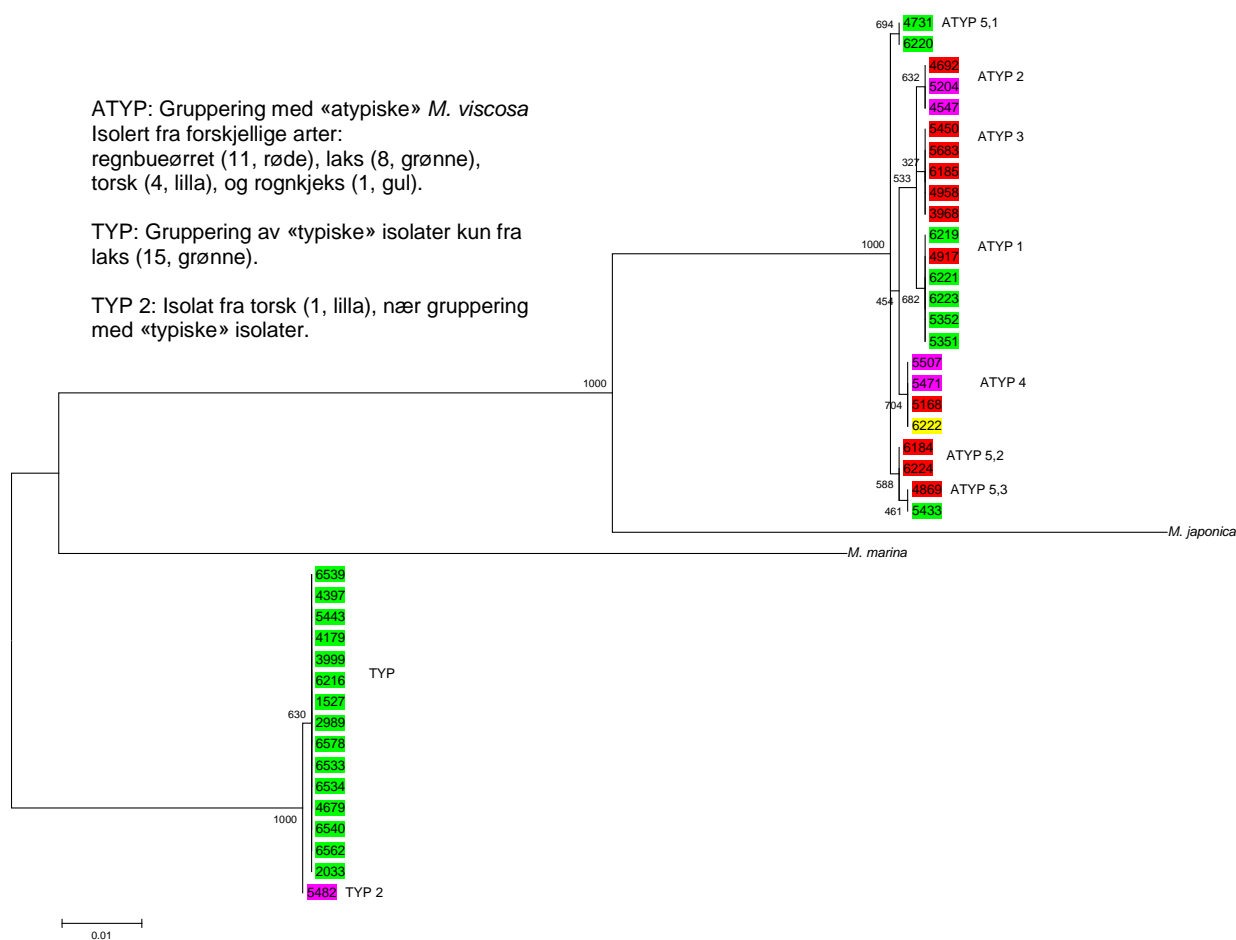
5 Resultater

5.1 Sekvensering av *gyrB* –genet

Etter amplifikasjon ble PCR- produktet rensset, og syklussekvensering foregikk med et DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. Sekvensering av *gyrB*- genet ble foretatt av laboratoriet ved Molekylærbiologisk enhet (MBE) ved Veterinærinstituttet i Oslo (NVIO) med et MegaBACE 1000TM automatisk sekvenseringssystem (Amersham). Kromatogrammer ble sammenstilt og korrigert i programmet ContigExpress (komponent av Vector Advance NTI v10.0.1, Invitrogen).

Innledningsvis var det vanskeligheter med å amplifisere DNA med PCR, men å bytte fra DyNAzymeTM til TAQ DNA Polymerase viste seg å løse dette. Videre ble utelukkende Taq DNA polymerase benyttet til amplifikasjon av DNA for sekvensering.

I de ni siste stammene i tabell 5, kapittel 4.6 (NVIO 6216 – 6224, *M. marina* og *M. japonica*) ble en sekvens på minst 926 bp ferdig sammenstilt, med konsensus mellom kromatogrammene fra både pluss og minus DNA-tråder. I de første syv stammene ble ikke hele området på 926 bp ferdig sekvensert. Det ble ikke prioritert å sekvensere hele området, da også MBE- laboratoriet ved NVIO hadde utført *gyrB*-sekvensering av disse stammene. Konsensussekvenser fra 40 *M. viscosa*-stammer (syv fra denne studien i tillegg til andre som ble sekvensert ved NVIO, beskrevet i Grove et al. 2010), *M. marina* og *M. japonica*, på 926 bp ble analysert med programmet PhyML v. 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>). En liste over disse stammene er gitt i tabell 6, kapittel 4.6, og det resulterende dendrogrammet er gitt i figur 7.



Figur 7. Dendrogram etter analyse av 40 *gyrB* genskvenser fra *M. viscosa*, *M. marina* (NCIMB 1144) og *M. japonica* (JCM 10249) med programmet PhyML v. 3.0. «Bootstrap»- verdier er gitt som antall av 1000 retester. «Typisk» og «Atypisk» er betegnelser brukt om gruppene av Grove et al. (2010), og stammene er gitt betegnelser etter dette, i tillegg til undergrupperinger, som er gitt ved tall. Fargekoder gir fiskeart isolatene kommer fra: grønn = laks, rød = regnbueørret, lilla = torsk, lyseblå, gul, og mørkegrønn er hhv leppefisk, kveite og rognkjeks.

Forskjellen i nukleotidsekvens (aminosyresekvensforskjellen er gitt i parentes) mellom de to hovedgruppene med *M. viscosa* er 11 % (5 %). Forskjellene mellom den atypiske gruppen og henholdsvis *M. japonica* og *M. marina* er 8 % (3 %), og 14 % (7 %). Mellom den typiske gruppen og *M. japonica* var forskjellen 13 % (5 %), mens ulikheten med *M. marina* var 11 % (3 %). Innad blant de «atypiske» isolatene (øverst i figur 7) er forskjellene 0,3 til 0,7 % (0,3 - 0,7 %). I den nederste gruppen er de «typiske» lakseisolatene 100 % identiske, mens det ene torskeisolatet har én «stille» basesubstitusjon på de 926 baseparene, det vil si 0,1 prosent forskjellig nukleotidsekvens.

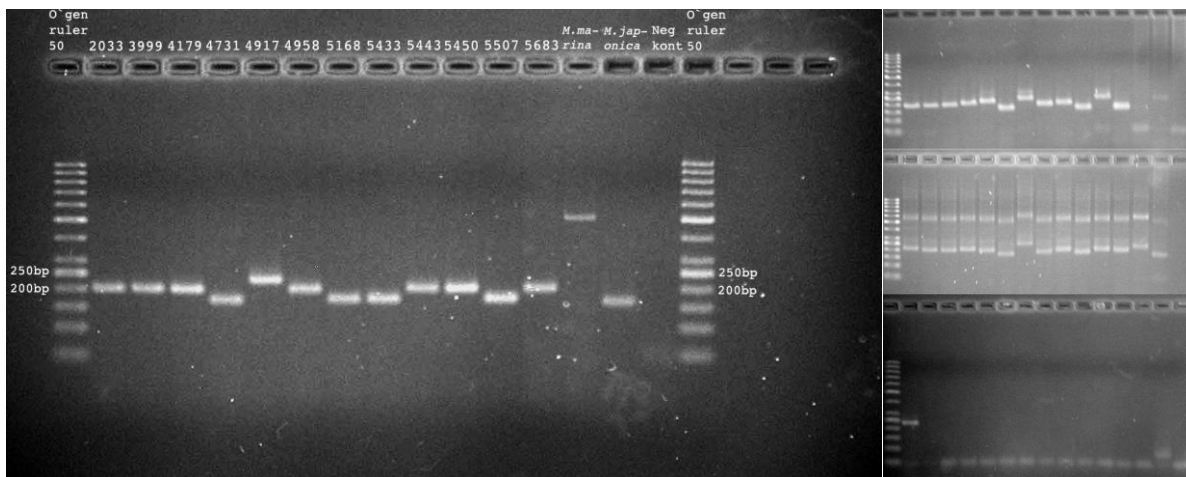
5.2 Utvikling av og analyse med Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Det ble utviklet en multilokus VNTR-analyse for bakterien *Moritella viscosa* for kapillærelektroforese med seks loki. Det var opprinnelig utviklet en metode for separasjon av seks PCR-produkter med agarose gelelektroforese, som ble overført til separasjon ved hjelp av kapillærelektroforese med fluorescerende prober.

5.2.1 Utvikling av MLVA for agarose gelelektroforese

5.2.2 Identifisering av VNTR- loki

Innledningsvis ble 20 av de 31 TR-loki som ble funnet med programmet Tandem Repeats Finder v. 4.00, undersøkt ett og ett ved PCR og agarose gel elektroforese, for PCR- produkt uten uspesifikk binding av primere, og variasjon mellom lokiene. I 8 av de 20 områdene ble det påvist single PCR- produkt fra alle *M. viscosa* isolatene (se eksempler på UV-bilder i figur 8), i tillegg til variasjon i produktstørrelse mellom stammene.



Figur 8. UV- bilde etter PCR-amplifikasjon og agarose gelelektroforese av TR-loki. Til venstre: TR-loki VNTR 20, med single bånd i alle brønner med prøver fra *M. viscosa*, samt *M. japonica*. Til høyre, øverst til nederst (prøvene er applisert som i gelen til venstre): VNTR 15, bånd i alle brønnene med prøver av *M. viscosa*. VNTR 16, uspesifikke PCR-produkter i alle brønnene. VNTR 18, produkt kun i den første brønningen (tystemmen, NVIO 2033). Rekkefølge av prøver er identisk i alle gelene. Markøren er O'GeneRuler 50 bp, kontrasten er økt for å tydeliggjøre båndene.

I tabell 18 er det gitt en oversikt over resultatene fra PCR-amplifikasjon av TR-loki VNTR 1 til VNTR 20.

Tabell 18. Oversikt over resultater etter PCR-amplifikasjon av 20 TR-loki.

TR- lokus	NVIO 2033	NVIO 3999	NVIO 4179	NVIO 4731	NVIO 4917	NVIO 4958	NVIO 5168	NVIO 5433	NVIO 5443	NVIO 5450	NVIO 5507	NVIO 5683	M. marina	M. japonica	Synlig variasjon
VNTR 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	Ja
VNTR 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	Ja
VNTR 3	1	1	1	x	1(x)	1	1(2x)	1(2x)	1	1	1(2x)	1	0	-	Ja
VNTR 4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	Nei
VNTR 5	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	-	Ja
VNTR 6	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	-	Ja
VNTR 7	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	-	Ja
VNTR 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	-	Nei
VNTR 9	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	x	0	0	-	Ja
VNTR 10	1	1	1	1*	1*	1*	1*	1*	1	1*	1*	1*	1	-	Ja
VNTR 11	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1*	0	-	Ja
VNTR 12	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	-	Ja
VNTR 13	1	0	1	x	x	x	x	0	1	x	x	x	0	0	Nei
VNTR 14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	Ja
VNTR 15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	Ja
VNTR 16	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	1(x)	Ja
VNTR 17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	x	1(2x)	Ja
VNTR 18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
VNTR 19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	x	1	Ja
VNTR 20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	x	1	Ja

x Uspesifikt produkt
 * Svake bånd

5.2.3 Multipleks PCR- amplifikasjon av VNTR loki og separasjon med agarose gelelektroforese

Flere kombinasjoner med primere som tidligere hadde gitt ett produkt per prøve ble utprøvd i multiplex PCR- reaksjoner, og produktet ble separert med agarose gel elektroforese.

Resultater fra de forskjellige forsøkene er gitt i tabell 1- 12, vedlegg 2. De første forsøkene, der det ble brukt DyNAzyme™ II DNA Polymerase, viste lite eller ingen PCR-produkter.

Byttet til et QIAGEN® Multiplex PCR Kit medførte substansielt bedre resultater, og det ble brukt videre.

5.2.4 Konvertering til Kapillærelektroforese fra gel og analyse av VNTR.

Det ble besluttet å overføre den gelbaserte metoden til kapillærelektroforese, noe som medførte flere endringer.

5.2.4.1 Identifisering nye VNTR- loki

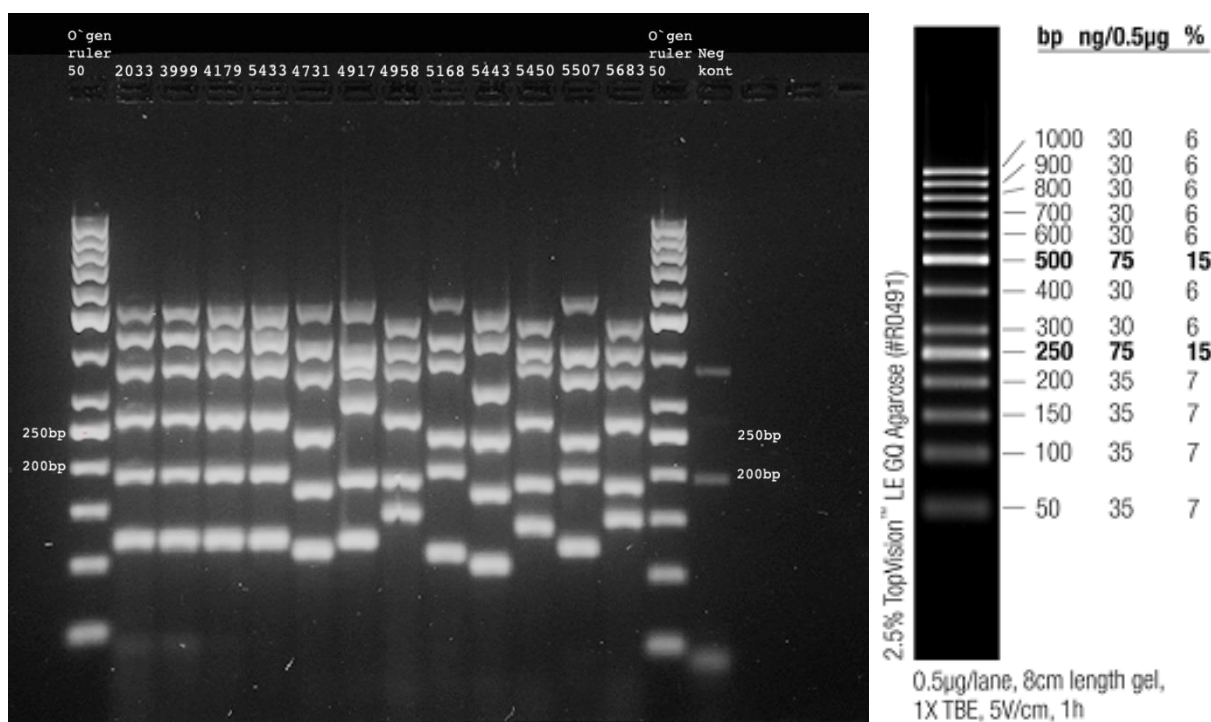
Det ble designet nye primere på bakgrunn av resultater fra den gelbaserte metoden, samt for å tilpasse metoden til DNA-markøren (Geneflo™ 625 Size Standard, TAMRA-Labeled, Chimex) som ble brukt i kapillærelektroforese. Primerne ble utprøvd med PCR med DyNAzyme™ II DNA Polymerase, og DNA-templat fra typestammen og NVIO 6184.

Resultatene etter agarose gelelektroforese er gitt i tabell 19.

Tabell 19. Resultater etter PCR med nye primere og DNA fra to stammer, og separasjon med agarose gelelektroforese.

Fwd primer	Rev primer	Resultater	
		NVIO 2033	NVIO 6184
<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>	Bånd	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_27_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_27_R#2</i>	Bånd	Bånd, uspesifikt produkt
<i>M.viscosa_VNTR_25_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_25_R</i>	Ikke bånd	Ikke bånd
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#3</i>	Bånd, uspesifikt produkt	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_15_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R</i>	Bånd	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_6_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	Bånd	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_28_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_28_R</i>	Bånd	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_21_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_21_R</i>	Bånd	Bånd

En ny kombinasjon med 6 primere ble deretter valgt ut til en multipleks PCR-reaksjon med DNA fra tolv *M. viscosa*- stammer i en multipleks PCR, som ble separert på agarose gelelektroforese. Bilde av gelen under UV-belysning er gitt i figur 9, og viser at alle stammene hadde seks PCR-produkter fra ca 100 til 600 bp, som er innenfor rekkevidden til markøren Geneflo™ 625 Size Standard, TAMRA-Labeled (Chimerx) for anvendelse i kapillærelektroforese, og primerkombinasjonen ble brukt videre.



Figur 9. Til høyre: vurdering av primerkombinasjon i multipleks PCR med separasjon på agarose gel elektroforese. DNA-templat fra tolv stammer av *M. viscosa*. Til høyre: Markøren, O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, SM1133, (Fermentas). Ingen fragmenter overgikk 600 bp. Kontrasten er økt for å tydeliggjøre båndene. Alle prøvene hadde seks tydelige bånd, og primerkombinasjonen ble beholdt videre for å analyseres med kapillærelektroforese. Negativ kontroll har PCR-produkt, sannsynligvis forårsaket av kontaminasjon, men det ser ikke ut til å ha påvirket de andre prøvene.

5.2.5 Analyse med kapillærelektroforese

Det ble bestilt seks primere med fluorescerende prober på 5- enden til multipleks PCR, og kapillærelektroforese ble gjennomført med en 3130 xl Genetic Analyzer (ABI), resultatene ble analysert med GeneMapper v. 3,7 (ABI).

Ved anvendelse av den innledende multipleks PCR-metoden (kapittel 4.4.3.1) ble det ble observert såkalte «N-1» splittopper i kromatogrammet ved lokuset VNTR 6 (figur 10), og til dels ved lokuset VNTR 20, i tillegg til at en del prøver hadde stor forskjell i størrelsen på toppene. Enkelte topper var ofte for kraftige til å gi en nøyaktig fragmentstørrelse, og andre var for små til å kunne markeres i analyseprogrammet GeneMapper v. 3,7 (ABI). Spesielt i fragmentene fra området VNTR 15 var det ofte svake signaler (figur 10), og toppene lot seg ikke markere i flere av prøvene.

5.2.6 Optimalisering av PCR- oppsettet

Det ble utprøvd flere endringer fra det opprinnelige PCR-programmet med hensikt å fjerne splittopper og å jevne ut forskjellene i topphøyde.

5.2.6.1 “Touchdown” PCR

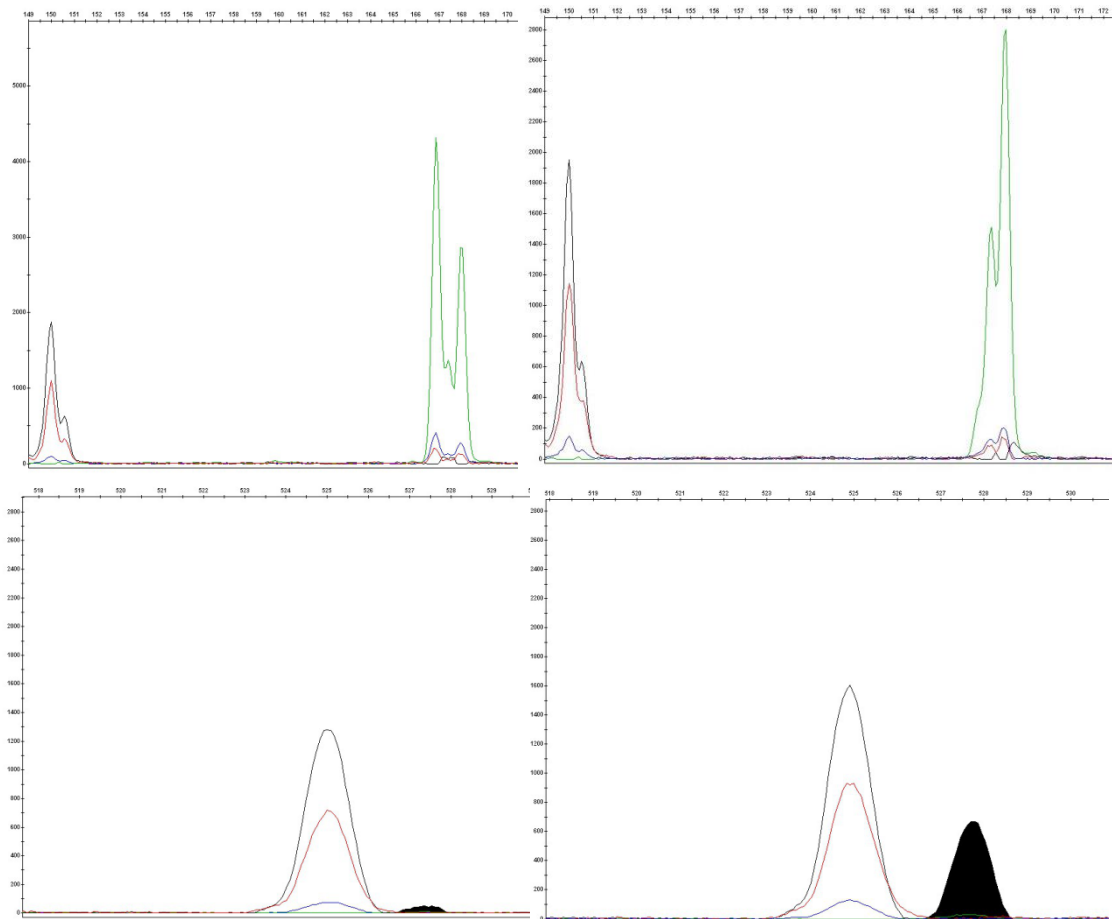
Etter «touchdown» PCR manglet det produkt i alle prøvene som hadde normal konsentrasjon av primere. For de øvrige prøvene gav ikke «touchdown» PCR noen reduisering av splittopper, men halvering av primerkonsentrasjon (med unntak av primerere til lokuset VNTR 15) så ut til å gi noe utjevning av forskjellene i topphøyde.

5.2.6.2 Redusering av hybridiseringstemperatur og test av alternativ primer

Forsøket med å bytte til den opprinnelige VNTR 6- primeren, reduisering av hybridiseringstemperaturer i PCR-syklusen fra 57 til 55 °C, og tilsvarende variasjon av konsentrasjon av primere som over, utgjorde ingen synlig bedring i kromatogrammene. Splittopper i VNTR 6 – fragmentet var fortsatt til stede og VNTR 15- fragmentet manglet i alle prøvene med templat fra 4731.

5.2.6.3 Reduksjon av templat, primer og endring av PCR-syklus

Redusering av konsentrasjon av alle primere og mengde DNA-templat jevnet ut størrelsen på fragmenttoppene, og VNTR 15- fragmentet gav et betydelig sterkere signal (figur 10 nederst). Prøvene med reduksjon i antall PCR-sykluser fra 35 til 30 og økning av det nest siste elongeringstrinn fra 30 til 60 min hadde mindre variasjon i topphøyde, og problemet med n-1 splittopper ble bedret (Figur 10, øverst).



Figur 10. Resultater før (til venstre, fortyning 1:150) og etter (til høyre fortyning 1:75), endringene beskrevet i punkt 3 ovenfor fra opprinnelige multiplex PCR-metode, med DNA fra stammen NVIO 4731, visualisert i GeneMapper v. 3,7.

Øverst: Reduksjon av n-1 splittopp på VNTR 6- lokuset. Til venstre: innledende metode gav tydelige splittopper. Til høyre: Etter endringer i PCR-oppsettet ble splittopper redusert betraktelig, men ikke helt eliminert.

Nederst: Bedring av svakt signal fra VNTR 15- lokuset. Til venstre: toppen (svart) har et svært svakt signal, og prøver med svakere signal enn dette lot seg ikke skille fra støy med programvaren. Til høyre: Fortynningsfaktoren er halvparten, men toppen er likevel rundt ti ganger høyere.

5.2.6.4 Endring PCR- syklus

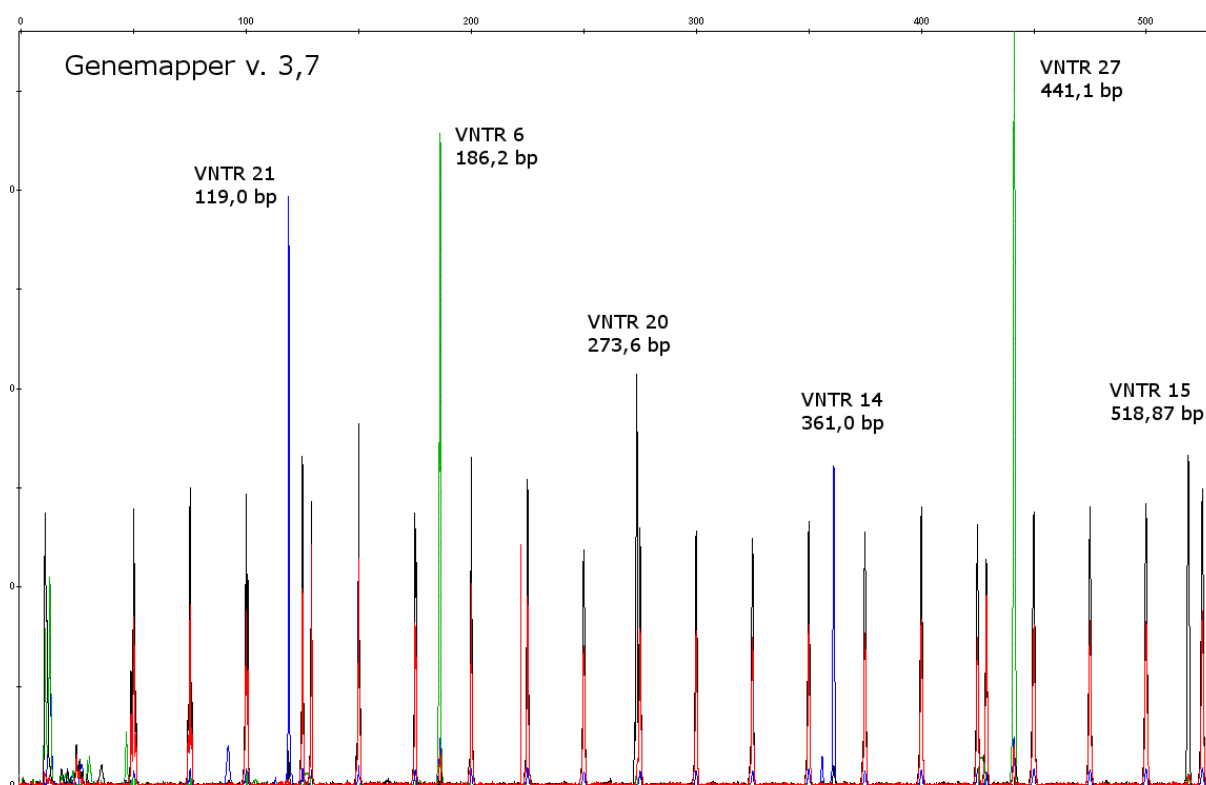
Fjerning av siste steg på 72 °C i 10 min (som ikke var i leverandørens anbefalinger) så ikke ut til å påvirke resultatene, og denne endringen ble beholdt.

5.2.6.5 Gradient -PCR

Gradient PCR, med 4 forskjellige hybridiseringstemperaturer (57,2 -58 -59,2 -60 °C) gav like resultater på alle prøvene, så den opprinnelige temperaturen (57 °C) ble beholdt.

5.2.7 Analyse av MLVA med kapillærelektroforese

Med unntak av tre stammer ble fragmentstørrelse målt i alle seks VNTR- loki i alle *M. viscosa*-prøvene. I stammene NVIO 5472 og NVIO 7817 manglet fragmentene fra henholdsvis VNTR 15- og VNTR 6. Stammen NVIO 5472 ble retestet to ganger, men det ble igjen ikke observert topper for det manglende fragmentet. Stammen med frysernummer 5353 manglet totalt PCR- produkt i kapillæren, og to retester viste identisk resultat. Det ble heller ikke observert PCR- produkter i kapillæren med prøvene fra referansestammene *M. marina* og *M. japonica*. Figur 11 gir et eksempel på kromatogrammet visualisert med GeneMapper v. 3,7 etter analyse av typestammen, NVIO 2033, med metoden. Tabell 3, vedlegg 1 viser fragmentstørrelse og beregnet antall repetisjoner på alle prøvene.

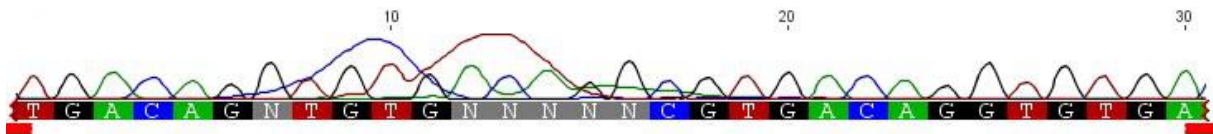


Figur 11. Kromatogram etter analyse av NVIO 2033 visualisert med programvaren GeneMapper v. 3,7 (ABI). DNA-markør er Geneflo™ 625.

5.2.8 Verifikasjon ved DNA -sekvensering.

Minst en variant av hver fragmentstørrelse ble valgt ut til sekvensering av begge DNA-trådene med en 3130 xl Genetic Analyzer (ABI) (vedlegg 1, tabell 2), for å verifisere at det var varierende antall tandemrepetisjoner som var årsaken til forskjeller i fragmentlengde. Kromatogrammene ble sammenstilt ved hjelp av programmet Sequencher v. 4,5.

Flere av kromatogrammene inneholdt støy av typen «dye blob» («fargestoffbobler»), som kan forårsakes av dårlig rensing etter sekvenseringsreaksjonen (ABI manual). Disse prøvene måtte korrigeres manuelt (eksempel i figur 11), eller inneholdt store områder som var uleselige, og disse ble analysert på nytt.



Figur 11. Kromatogram etter sekvensering av lokuset VNTR 15, i stammen NVIO 2033, visualisert med Geneious v7.1.7 (<http://www.geneious.com>, Kearsse et al., 2012). Støy av typen «dye blob» fører til at programvaren ikke finner basen, men kan i dette tilfellet manuelt korrigeres da det er leselige topper under.

Foruten en prøve, resulterte alle analysene i ett kromatogram eller flere overlappende kromatogrammer fra hver DNA-tråd som spant over hele repetisjonsområdet, i tillegg til en del av det flankerende området slik at start og slutt på repetisjonsområdet kunne konfirmeres. I en av prøvene (7827 VNTR 14) var det kun den ene av DNA tråden som resulterte i et lesbart kromatogram, selv om begge trådene ble forsøkt sekvensert to ganger. I dette tilfellet ble to kromatogrammer fra den samme tråden brukt i sammenstillingen, da begge var uten støy eller tvetydige topper.

DNA- sekvensene ble eksportert til FASTA- filer og antall repetisjoner ble telt manuelt i tekstbehandlingsprogrammet ConTEXT. Alle sekvensene ble sammenstilt ved hjelp av clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), her ble også flankerende sekvenser uten konsensus fra den andre tråden inkludert. Det ble ikke observert insersjoner eller delesjoner i disse områdene, men noen få basesubstitusjoner.

I alle sekvensene med unntak av VNTR 27 stemte antallet repetisjoner overens med det som var forventet fra fragmentstørrelsen. Noen av repetisjonsenheter var «urene» repetisjonsenheter, det vil si at hver enhet ikke var fullstendig like, men lengden på hver enhet var konserverv. I de flankerende sekvensene ble det observert noe polymorfisme, men ikke

insersjoner eller delesjoner, med unntak av sekvensene fra lokus VNTR27. I to av stammene der dette lokuset ble sekvensert (NVIO 2033 og NVIO 7712), ble det funnet en enkelt direkte tandemrepetisjon av en 30 bp sekvens (2*30 bp), ett bp (A, og G i en stamme) til siden for repetisjonsområdet (5*GTTTTG), det vil si en sammensatt repetisjon. Den samme sekvensen på 30 bp var til stede i de resterende stammene der lokuset ble sekvensert, men den var ikke repetert, noe som kan sees i figur 12 under. På bakgrunn av dette ble lokuset sekvensert i stammen NVIO 7762, der det ble observert den samme fragmentlengden som de to stammene nevnt ovenfor. Her viste lokuset seg å inneholde en annen kombinasjon som gir det samme antallet baser: 10*GTTTTG + 1*30 bp.

```

4547      TTTTCGGTTTTCG-----GTTTCGAGACTTTGGCAAC
2033      TTTTGGTTTTGATTCGAGACTTTGGCAACAACGGTTTTGCTTTCGAGACTTTGGCAAC
7712      TTTTGGTTTTGATTCGAGACTTTGGCAACAACGGTTTTGCTTTCGAGACTTTGGCAAC
4731      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
4889      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
5168      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
5450      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
6159      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
7261      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
7828      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
7263      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
4869      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
5482      TTTTGGTTTTG-----ATTTTCGAGACTTTGGCAAC
***      ***** *                               ,***** ,*****

4547      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
2033      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
7712      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
4731      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
4889      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
5168      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
5450      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
6159      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
7261      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
7828      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
7263      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
4869      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
5482      AACTGGTTTTGCTTTCACTGGTGCTTTAACTTTTACCGGAGGAGTTACTTTAGCCGTAAC
*****

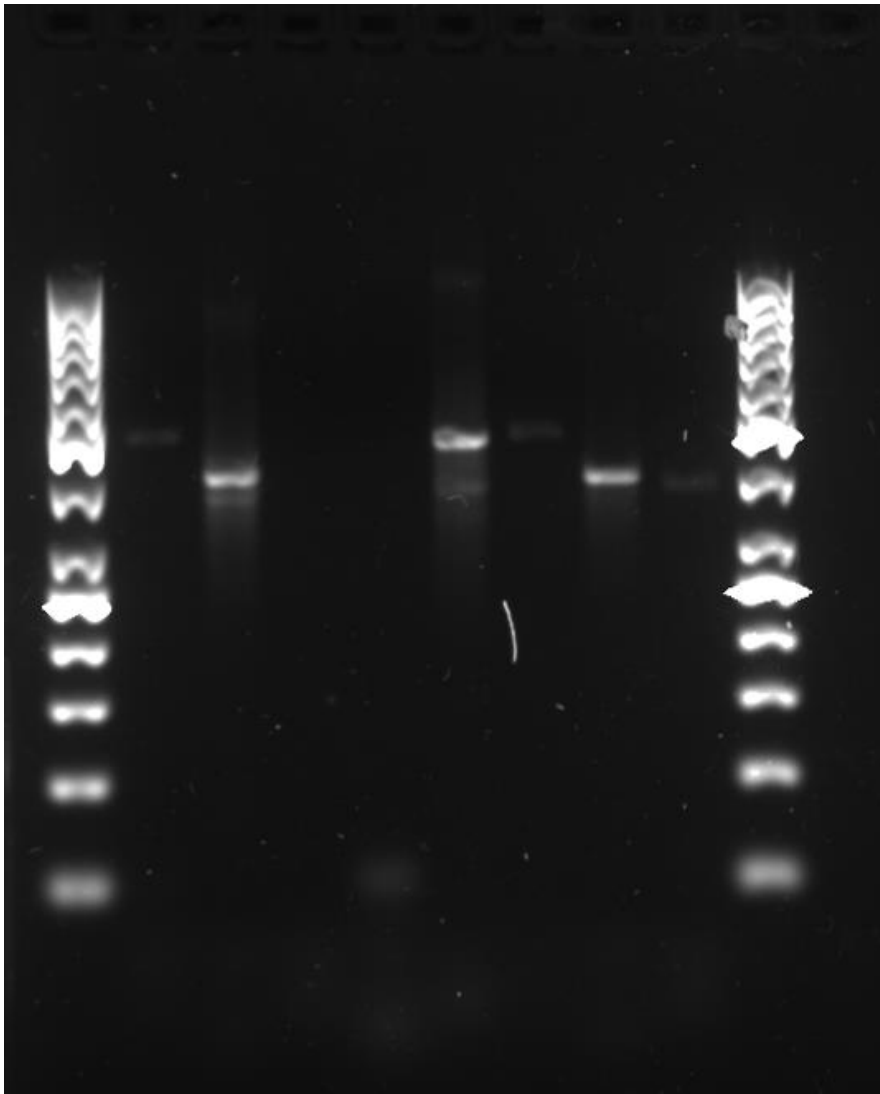
```

Figur 12. Sammensatt repetisjon i lokus VNTR 27 visualisert etter sammenstilling med programmet clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). I stammene NVIO 2033 og NVIO 7712 blir 30 bp repetert. Repetisjonen begynner etter første A rett til siden for en tandemrepetisjon med enheter på seks bp (GTTTTG, sees oppe til venstre). Sekvensen er ikke repetert i de andre stammene. Fragmentstørrelse kan i dette tilfellet ikke brukes til å beregne antall repetisjoner, da forskjellige sammensetninger kan gi den samme fragmentstørrelsen.

5.2.9 Spesifikk PCR for sammensatt repetisjon

Det ble designet primere for spesifikt å kunne identifisere dimorfismen i lokus VNTR 27, og etter PCR- amplifikasjon av en stamme med (NVIO 2033) og en stamme uten dimorfismen

(NVIO 7263), som begge hadde den samme fragmentlengden, ble det tatt bilde av gelen under UV-belysning (figur 13).

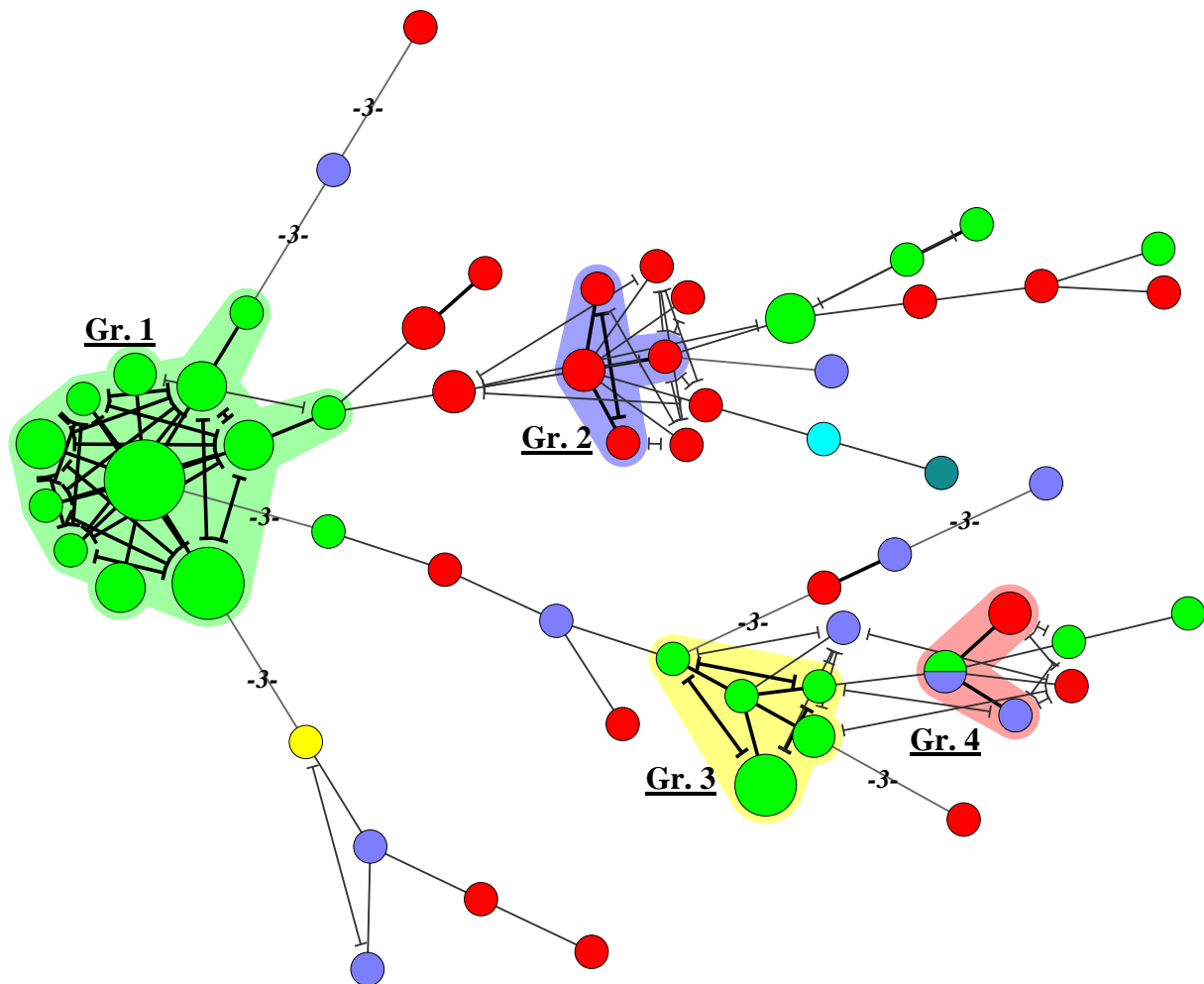


FIGUR 13. Agarose gelelektroforese etter testing av primere spesifikt for en sammensatt repetisjon i VNTR 27-lokuset. Innhold av primerkombinasjoner for brønnene er gitt i tabell 14, kapittel 5.2.9. Markøren er O'GeneRuler 50 bp.

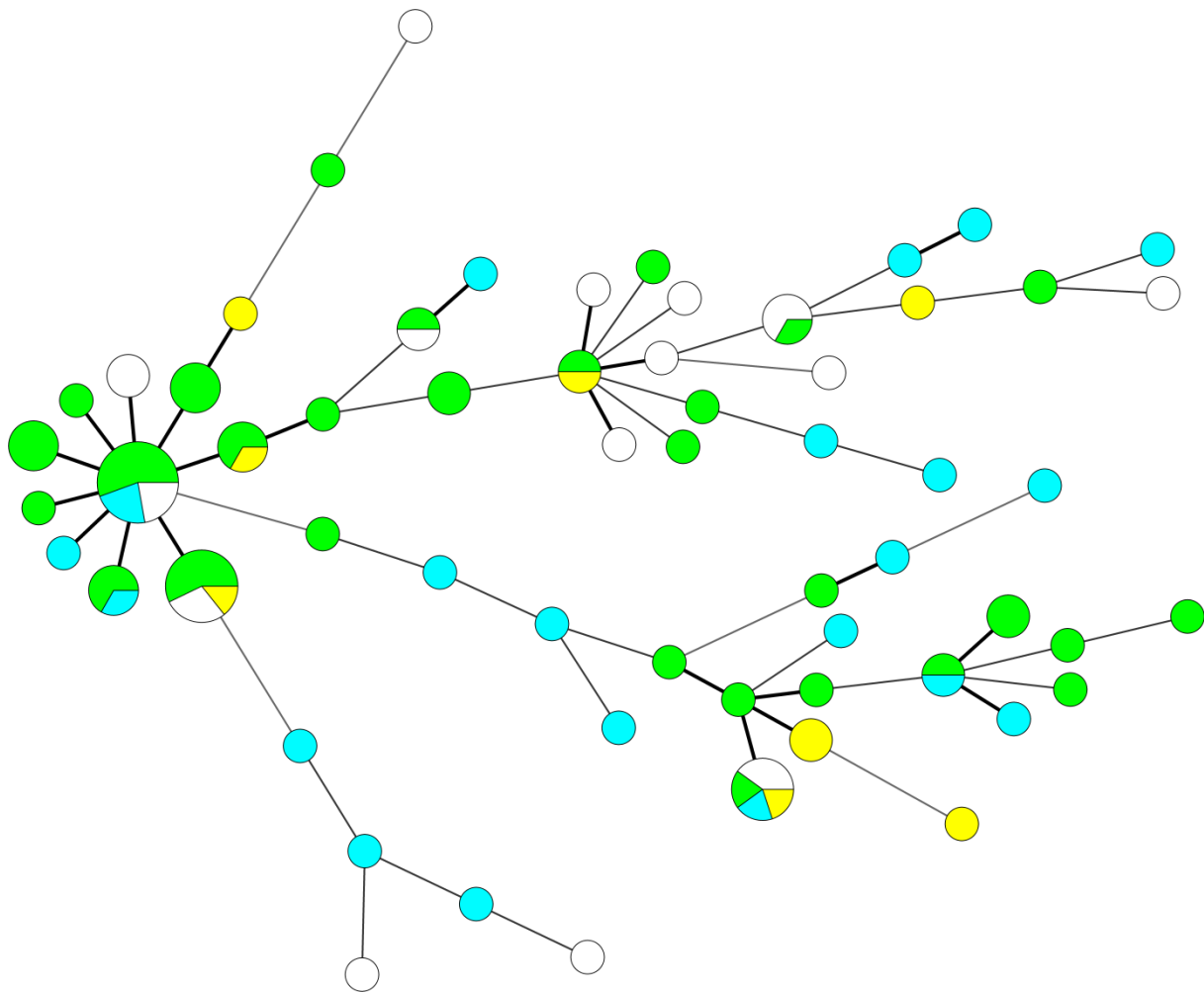
Det kan sees fra gelen at prøvene med DNA fra typestammen (brønn 2 til 6) manglet produkt i en del av brønnene, og det er synlige bånd i alle prøvene med DNA fra NVIO 7263 (brønn 7-9). Det betyr at primerne ikke spesifikt binder seg til kun den sammensatte repetisjonen, som var formålet, og ikke kan benyttes til å skille de to variantene. Derfor ble VNTR 27-lokuset fjernet fra videre analyser.

5.2.10 Analyse av data med Bionumerics v. 6.1

VNTR-data og stammenummer, samt informasjon om vertsfisk, virulens og geografi, anleggskode, og gruppebetegnelse etter analyse av genen *gyrB* (som sees i figur 7, og bakteriedatabasen ved NVIO, som er benevnt «TYP» eller ATYPx) ble importert til og analysert med programmet Bionumerics v. 6.1 (Applied-Maths). Det ble generert dendrogrammer ved hjelp av MST- og UPGMA- algoritmene. Fargekoding med informasjon om vertsfisk og virulens er gitt i MST-figurene (14 og 15), mens UPGMA- dendrogrammet (figur 16) er fargekodet med vertsfisk, og inneholder all øvrig informasjon om isolatene som ble importert i Bionumerics. Det ble funnet klonale komplekser av enkeltlokusvarianter i MST- dendrogrammet, som vises som gruppe 1-4 i figur 14.



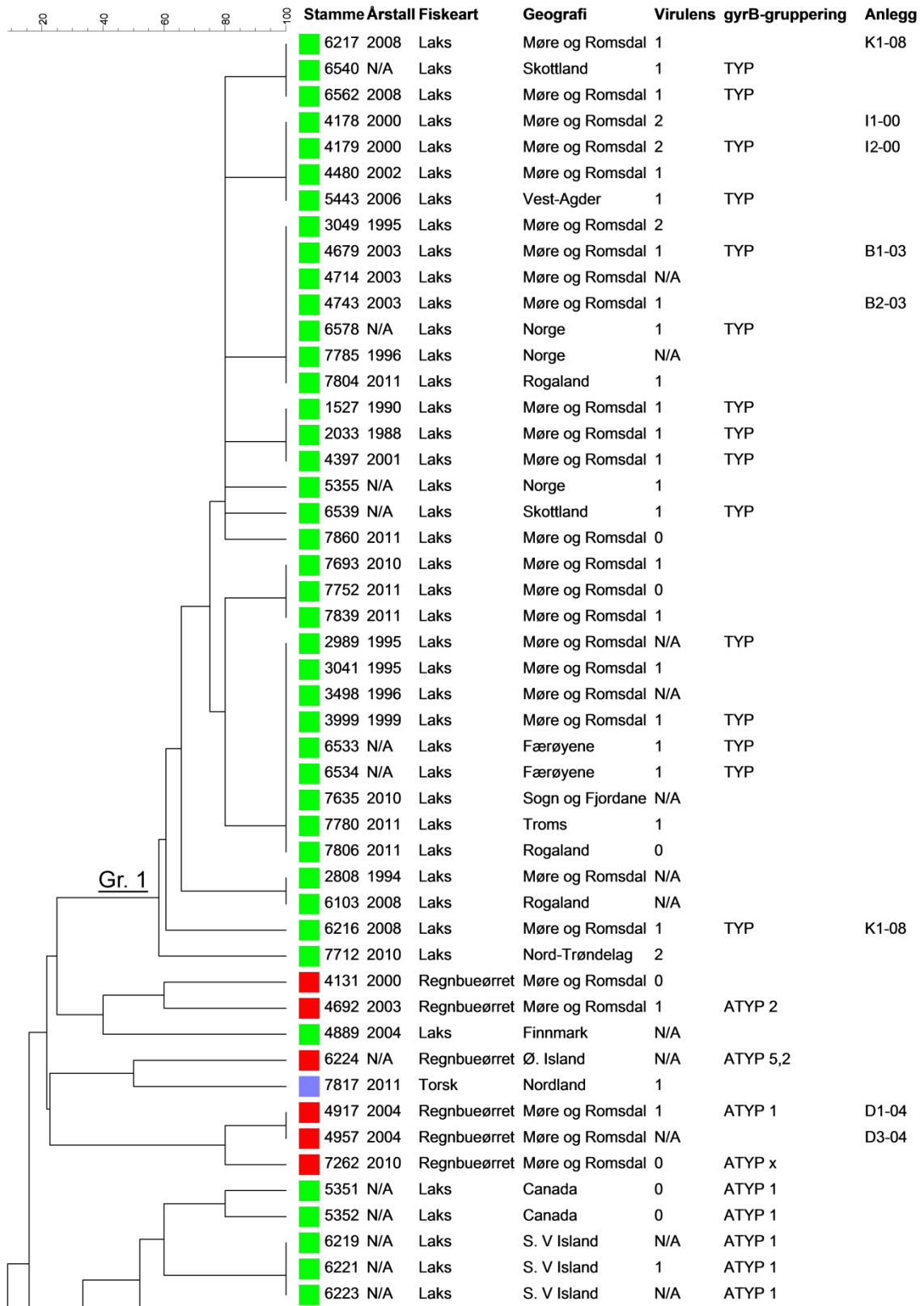
Figur 14. Dendrogram etter analyse av VNTR-data i Bionumerics v. 6.1 med MST- algoritmen. Sirklene representerer en genotype, og er proporsjonal med antall isolater med identiske genotyper. Fargekodene gir hvilken fiskeart stammene er isolert fra: grønn = laks, rød = regnbueørret, lilla = torsk, mørkegrønn, lyseblå og gul er fra hhv leppefisk, kveite og rognkjeks. Distanse mellom isolatene: tykke, tynne og lange tynne streker betyr henholdsvis forskjell ved ett, to og tre (tre er angitt i figuren) av fem loki. Programmet identifiserte fire grupperinger (gr. 1-4) med maks forskjell én.

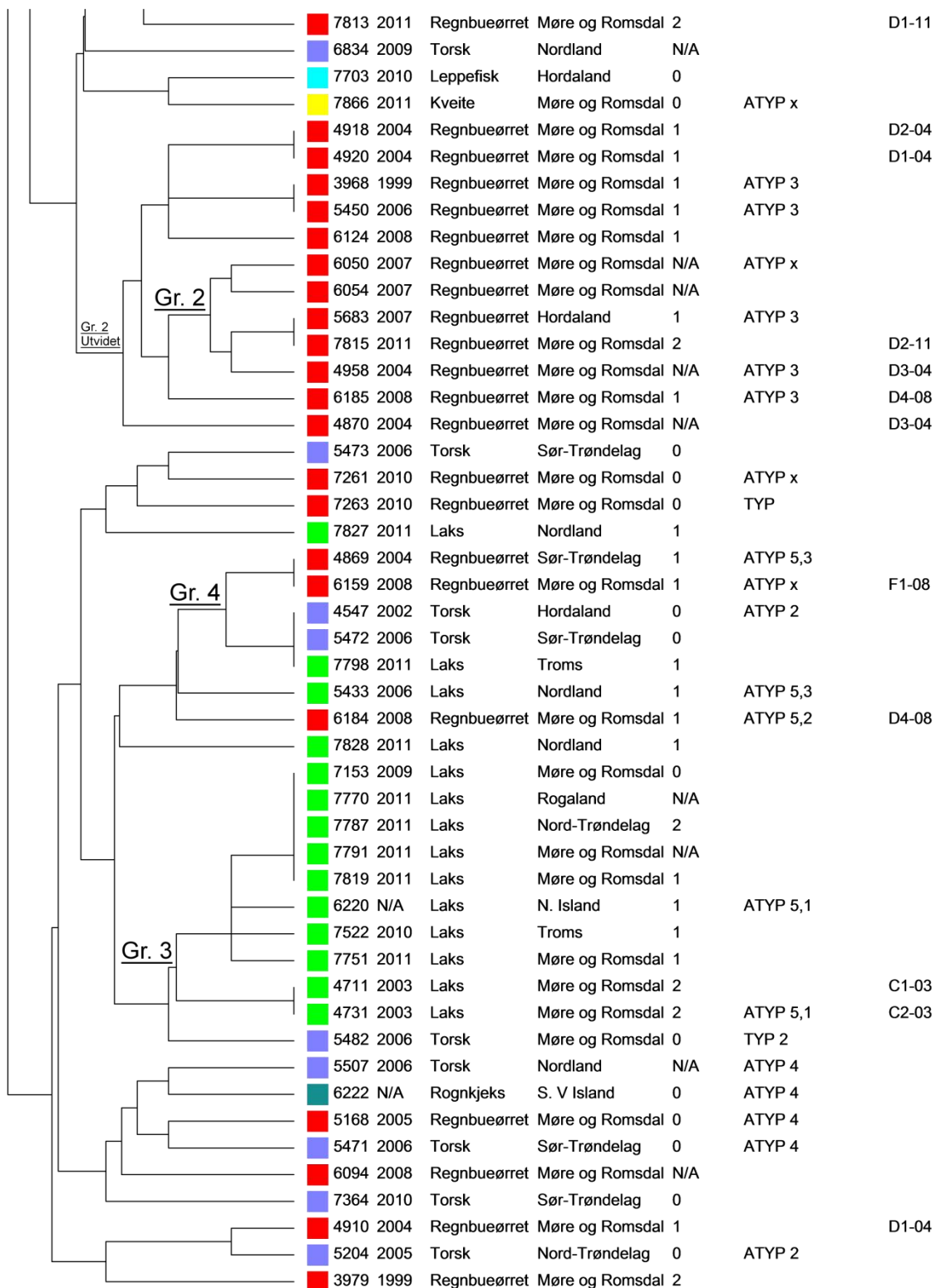


Figur 15. Dendrogram etter analyse av data i Bionumerics v. 6.1 med MST- algoritmen, fargekodet med virulensnivået som ble satt for isolatet: Blå: 0, Grønn:1, Gul:2, og hvit: N/A.

Det ble generert et dendrogram etter analyse av med UPGMA- algoritmen for kategoriske data, som gis i figur 16. De klonale kompleksene som ble funnet i MST er lagt inn i figuren.

VNTR





Figur 16. De to foregående sider: Dendrogram etter analyse av 97 stammer av *M. viscosa* med UPGMA-algoritmen for kategoriske data. Fargekoding er etter fiskeart, i tillegg er informasjon om årstall, geografisk opphav, virulens og anleggskoder (jfr tabell 2, kap 4.3), og *gyrB*- grupperinger og undergrupperinger fra figur 7. Det er angitt klonale komplekser som ble funnet med MST-algoritmen i figur 14 ved gruppens knutepunkt (Gr. 1-4). «Gr. 2 utvidet» er stammer som er tett inntil gruppe 2 og muligens også del av den samme klonale gruppen.

5.2.11 Klonale grupper

Oppdelingene i figur 14 (MST) samsvarer med fire grupper i UPGMA- dendrogrammet i figur 16, og er angitt der som «Gr. 1- Gr.4», og de følgende observasjoner er fra figur 16 (UPGMA).

Gruppe 1 inneholder 36 isolater fra Norge (Vest-Agder til Troms, fra 1988 til 2011), samt alle isolatene fra Skottland og Færøyene. Alle stammene i denne gruppen er isolert fra laks, og for isolater der *gyrB* ble sekvensert, er alle i den typiske gruppen i figur 7. Virulensgraden er satt til 1 (24 stammer) eller 2 (3 stammer) i 27 av 31 stammer der virulensnivå ble satt.

Gruppe 2 består av fem isolater fra regnbueørret, fire fra Møre og Romsdal og ett fra Hordaland, isolert fra 2004 til 2007. I tillegg er det syv regnbueørretisolater som ligger tett inntil denne gruppen (dobbeltilokusvarianter), fra Møre og Romsdal. Disse ble isolert ifra 1999 til 2008, og er angitt sammen med gruppe 2 som «utvidet Gr. 2» i figur 16. Blant disse tolv isolatene har åtte stammer designert virulensgrad, en har grad 2 og syv har grad 1. Alle isolatene i undergruppen ATYP3 i figur 7 er også i denne utvidede gruppen.

I gruppe 3 er det ti isolater fra laks, et fra Nord-Island og ni norske, fra Rogaland til Troms (isolert i 2003 -09, -10, og -11). Virulensgrad i gruppen er satt til 0 i en stamme, 1 i fire, og 2 i tre stammer. For to stammer er virulensgrad ikke satt. De to isolatene i undergruppen ATYP 5,1 fra *gyrB*-analysen (figur 7) er også i denne gruppen (ingen andre stammer i gruppen er blitt *gyrB*-sekvensert). Et torskisolat ligger tett inntil, med tre loki felles med fire av isolatene i denne gruppen. Dette er isolatet som i *gyrB*-analysen ble gruppert tett med lakseisolater (NVIO 5482).

Gruppe 4 er den eneste grupperingen med isolater fra forskjellige fisk. Den inneholder to isolater fra regnbueørret og ett fra laks med virulensgrad 1, og to fra torsk med virulensgrad 0, isolert fra 2002 til 2011. Den geografiske opprinnelsen er fra Hordaland til Troms. To av isolatene har *gyrB*-sekvens som hører til to forskjellige undergrupperinger (ATYP 5,3 og ATYP 2).

5.2.12 Geografi

Det ble ikke funnet noen tydelig samsvar med geografisk opphav og grupperinger blant de norske stammene. Utvalget av stammer i studien er hovedsakelig Møre og Romsdal (60 av 106), da de fleste innsendelser til NVIO kommer derfra. Av de 97 stammene som ble analysert med programmet Bionumerics v. 6,2. var 55 (57 %) fra dette fylket. Derfor vil eventuelle større grupperinger som lokaliserer seg utenfor Møre og Romsdal muligens ikke bli fanget opp med utvalget i denne studien. Isolatene fra dette fylket er ikke gruppert eksklusivt i noen stor gruppe, men gruppe 2 har elleve isolater fra dette fylket og ett isolat fra Hordaland. I motsetning til de skotske og færøyske stammene, er Island og Canada er ikke representert i den typiske gruppen (gruppe 1). Islandske stammer er i hver sin gruppe som samsvarer med geografisk opprinnelse, med unntak av stammen F57, fra Sørvest-Island, som ikke grupperes med de andre isolatene derfra. De Canadiske isolatene er gruppert nært tre isolater fra Sørvest-Island.

5.2.13 Settefiskanlegg

Isolater fra tre settefiskanlegg med laks (I1, B1 og C1) hadde identiske VNTR-profiler med isolater fra anleggene de ble satt ut i: I2, B2 og C2.

5.2.14 Flere isolater fra samme anlegg og område

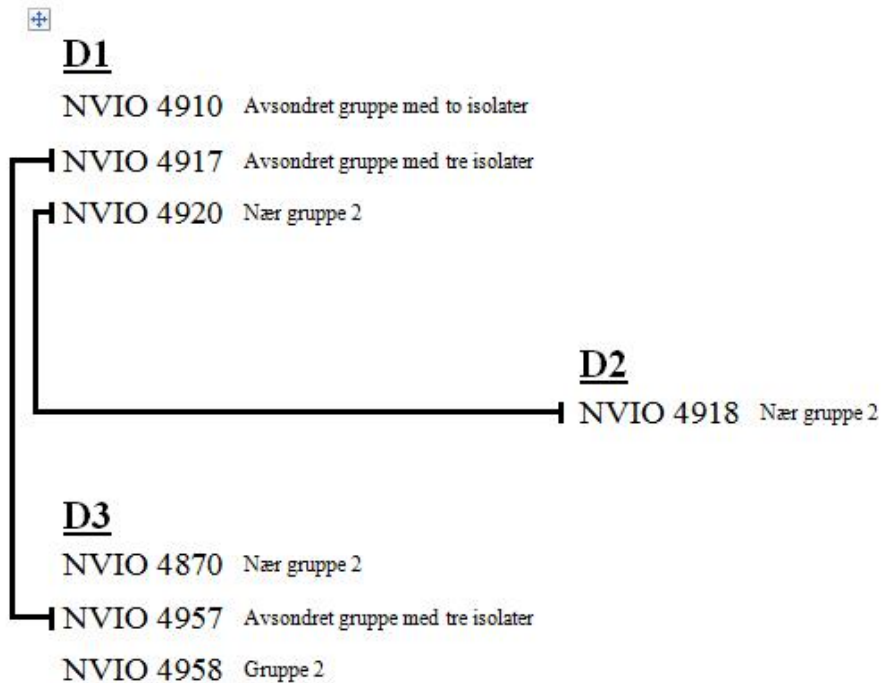
Foruten i anlegget K1-08, hvor det var laks, er alle anleggene beskrevet her oppdrettsanlegg med regnbueørret.

Anlegg der virulensnivå var satt til 0 er ikke lagt inn i UPGMA-dendrogrammet, men informasjon kan sees i tabell 2, kapittel 4.3. I to av disse anleggene, E1-06 og G1-10 var det tre ulike VNTR-profiler fra henholdsvis fem og fire isolater. I anlegg A1-02, H1-10, J1-09, var det identiske VNTR-profiler i alle, henholdsvis to, to og tre isolater.

Fra de følgende tre anleggene ble to isolater fra hvert anlegg analysert, og virulensgrad er satt til 1. I anlegg F1-08 har isolatene lik VNTR-profil. I anlegget D4-08 er det ulik VNTR-profil i begge isolatene. K1-08-isolatene er i den samme gruppen (gruppe 1), men de har to forskjellige VNTR-loki.

De syv isolatene fra anleggene «D-04» er fra et område innenfor en radius på cirka 2,5 kilometer i den samme fjorden i den samme tidsperioden. De ble designert 1 eller N/A i

virulens. I figur 17 under er det gitt en oversikt over forholdet mellom isolatene fra de tre anleggene.



Figur 17. Syv stammer fra anlegg D1- D3, lokalisert innenfor en radius på cirka 2,5 km. Linjene angir stammer med identisk VNTR-profil. Det er beskrevet hvordan isolatene er gruppert i UPGMA-dendrogrammet i figur 16. D1 og D2 har fått virulensgrad 1, mens D3 ikke er bestemt. Avsondrede grupper har lav likhet med andre grupperinger, gruppe 2 er den klonale gruppen beskrevet tidligere.

D1-11 og D2-11 er to anlegg med avstand ca 1,2 km og i begge anleggene er virulensnivået satt til 2. Her er det to ulike VNTR-profiler, isolatet fra anlegget D2-11 ligger i gruppe 2, og det fra D1-11 ligger nært de islandske og canadiske isolatene, men er ikke tett inntil disse.

5.2.15 BLAST-søk

Søk i NCBI's databaser med BLAST-algoritmen viste ingen treff i kodende sekvenser, hverken i repetisjons- eller flankesekvensene.

5.2.16 Beregning av diversitetsindeks og test for rekombinasjon

5.2.16.1 Diversitetsindeks

Hunter- Gaston indeksen (DI) for hvert VNTR-område og på hver VNTR-profil som ble funnet, ble beregnet med programmet V-DICE. Tabell 20 gir oversikt over resultatene fra beregningen.

Tabell 20. Antall alleler, Hunter- Gaston diversitetsindeks for hvert lokus, alle lokiene kombinert, og konfidensintervall (95 %).

Lokus	Antall alleler (94 stammer)	DI	Konfidensintervall (95 %)
VNTR 14	18	0,904	0,876 - 0,931
VNTR 15	14	0,771	0,694 - 0,849
VNTR 21	10	0,740	0,673 - 0,821
VNTR 6	6	0,734	0,692 - 0,777
VNTR 20	10	0,623	0,559 - 0,687
Samlet	60 unike genotyper	0,981	0,970 - 0,992

Diversitetsindekser for isolater kun fra laks var 0,944 (0,916 – 0,973), og for isolater fra gruppe 1 var den 0,886 (0,828 – 0,944).

5.2.16.2 Kolingsulikevekt

Ved hjelp av programmet LIAN v. 3.6 ble forventet varians, observert varians og assosiasjonsindeks beregnet, og det ble foretatt hypotesetesting der nullhypotesen var at populasjonen er i koblingslikevekt. Resultatene er gitt i tabell 21.

Tabell 21. Forventet (V_E) og observert (V_D) varians, assosiasjonsindeks (I_A^S), og hypotesetesting for koblingslikevekt.

Varians (V) og Assosiasjonsindeks (I)		Hypotesetesting ($H_0: V_D = V_E$), Monte Carlo (100 retester)	
V_D	1,7129	P-verdi	< 0,01
V_E	0,8823	5 % kritisk verdi	0,9303
I_A^S	0,2354		

5.2.17 Stabilitetstesting av VNTR- loki

Bakteriologilaboratoriet ved seksjon for fiskehelse (NVIO) gjennomførte 40 omsåinger (over totalt 56 døgn), av to stammer- NVIO 2033 (typestamme) og NVIO 5450 (fra regnbueørret), for å teste stabiliteten av VNTR- lokiene (totalt 56 døgn). Prøver fra hver 10. utstrykning, som ble analysert med metoden for kapillærelektroforese som beskrevet i kapittel 4.7.8. Det ble ikke observert endringer i fragmentstørrelse fra på noen av VNTR- lokiene i noen av prøvene.

6 Diskusjon

I denne studien ble det utviklet en multilokus VNTR-analyse (MLVA) for kapillærelektroforese basert på fem tandemrepeterende (TR) loki for den fiskepatogene bakterien *Moritella viscosa*. Til sammen ble 106 isolater av bakterien ble analysert med denne metoden. I tillegg ble genetisk variasjon undersøkt ved sekvensering og analysing av deler av genet *gyrB*. Genet ble også sekvensert i referansestammene *Moritella marina* og *Moritella japonica*.

6.1 Sekvensering av genet *gyrB*

Sekvensanalysen av husholdningsgenet *gyrB* viste en klar oppdeling i to grupper etter «maksimum likelihood» metoden (figur 7, kapittel 5), der stammer isolert fra laks grupperte seg i en svært homogen klynge med 100 % identitet på nukleinsyrenivå, med et torskeisolat tett inntil denne klyngen (99,9 % identisk på nukleinsyrenivå og ingen aminosyresubstitusjoner). Den andre grupperingen er en anelse mindre homogen (99,3 til 100 % identisk på aminosyrenivå), og bestod av *M. viscosa* isolert fra flere forskjellige fiskearter, hovedsakelig regnbueørret (11), og laks (9). Betegnelsen «typisk» vil bli brukt om den homogene gruppen med lakseisolater (som beskrevet av Grove et al. 2010), og betegner blant annet isolatene som var grunnlaget for den opprinnelige artsbeskrivelsen av Lunder et al. (2000), mens «atypiske» isolater vil bli brukt om de fleste isolater som ikke grupperer seg der, og unntak vil diskuteres for seg selv. Forskjellen mellom de to grupperingene var 11 % på nukleotidnivå, og 5 % i aminosyresekvens. Dette er i samme størrelsesorden som forskjellene de to gruppene har til de to andre artene fra genus *Moritella* som er inkludert i denne studien, og forskjellen mellom *M. japonica* og den atypiske gruppen er faktisk mindre (8 % og 3 %).

For de typiske isolatene er det en sterk assosiasjon med laks som vert. Den atypiske gruppen inneholder isolater fra flere fiskearter. Dette kan tolkes som at det finnes en spesialisert laksegruppe (gruppe 2), som har lav evne til å skape sykdom hos andre arter, mens den andre gruppen har et noe bredere vertsspektrum. Noen undergrupperinger i den atypiske gruppen kan se ut til å ha en viss artsspesifisitet (jfr figur 7). Det ble også, av Grove et al. (2010), rapportert om en sammenheng mellom *gyrB*- grupperingen og hemolysinproduksjon, puls felt gelelektroforese (PFGE), og plasmideprofilering, noe som underbygger antagelsen om en dyp divisjon i arten *M. viscosa*. Dette er nylig videre bekreftet av Karlsen et al. (2014b), som fant

at et insekticid toksin-lignende kompleks (*mitABC*) nesten utelukkende finnes i stammene fra den typiske grupperingen i *gyrB*-analysen. Selv om «bootstrap»- verdiene i undergrupperingene til dels er lave (fra 327/1000 til 704/1000) er treet i figur 7 topologisk likt de to studiene nevnt over. I hver av undergrupperingene er sekvensene identiske, så til tross for usikkerhet rundt hvor grenene bør være, representerer de alle en unik genotype.

6.2 Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Metoden MLVA for *M. viscosa* identifiserte 60 unike VNTR-profiler i de 106 stammene som ble analysert som gav resultater. For stammene *M. japonica*, *M. marina* og stammen NVIO 5353, ble det ikke observert fragmenter etter kapillærelektroforese, noe som sannsynligvis kommer av genetisk ulikhet. De to førstnevnte stammene er andre arter. Den sistnevnte ble kun beskrevet som «mulig *M. viscosa*» i bakteriedatabasen og er mest sannsynlig en annen, ikke bestemt art. Sekvensering av hver fragmentstørrelse viste at selv om enkelte av stammene hadde et delvis endret repetisjonsmotiv, var lengden på hver enhet bevart. Før analyse av data i programmet Bionumerics v. 6.1 ble ni av de 106 stammene med opphav fra det samme anlegget og med identisk MLVA-profil fjernet for å unngå en kunstig overrepresentasjon av disse genotypene. Tre stammer ble isolert ved settefiskanlegg, og senere ble identiske stammer isolert fra utbrudd i anleggene der fisken ble satt ut. De er derfor av epidemiologisk interesse, og alle disse er med i MST- og UPGMA-denrogrammene. Men da disse antakelig er den samme klonen, ble kun ett av hvert isolat tatt med ved analysen av diversitetsindeks og koblingsulikevekt.

Diversitetsindeks (Hunter-Gaston) ved de forskjellige lokiene varierte fra 0,623 (VNTR 20) til 0,904 (VNTR 14). Diversitetsindeksen for alle lokiene kombinert var 0,981 med et 95 % konfidensintervall på $\pm 0,011$. Dette ansees som tilstrekkelig resolusjon for et typingsystem (van Belkum et al. 2007), i tillegg til at den har et smalt konfidensintervall. Analyse med programmet LIAN v. 3.6 viste at sannsynligheten for at hypotesen om at det er koblingslikevekt er sann (P-verdi) er under 0,01, i tillegg til at den observerte variansen var langt høyere en 5 % kritisk verdi. Det betyr at det er koblingsulikevekt for allelene, noe som tyder på en lav rekombinasjonsrate. Det vil si at likheter og ulikheter mellom prøver kommer av mutasjoner, og at prøver som types likt sannsynligvis kan sies å være av det samme klonale opphav.

Analyse av VNTR-data med metodene «Minimum Spanning Tree» og «Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean» (MST, figur 14 og 15, UPGMA, figur 16, kapittel 5) viste, som i sekvensanalysen, at de typiske isolatene av *M. viscosa* er relativt lite varierte, og ble gruppert sammen i en stor, antakelig klonal gruppe. Isolater som ble gruppert utenfor denne gruppen viste større heterogenitet, men det ble ved hjelp av MST-algoritmen, i tillegg til den typiske gruppen, identifisert tre grupper som antakelig også representerer klonale komplekser. Disse gruppene finnes også i UPGMA-dendrogrammet. Utenfor disse gruppene er det hovedsakelig «singletonstammer» (fra engelsk «singletons», isolater med lavt likhet med andre isolater), små grupperinger med to og tre nært beslektede medlemmer, eller isolater som danner løse grupperinger med lav likhetsgrad. Med formål å vurdere stabiliteten av VNTR-markørene, ble det foretatt 40 gjenutsåinger av to stammer, et typisk og et atypisk isolat. Analyse med MLVA viste at ingen av TR-lokiene hadde endret seg, noe som indikerer at mutasjonsraten ikke er ekstremt høy, og sannsynligvis vil ikke markørene ha endret seg etter at bakteriene ble isolert, eller lagret og rekultivert i laboratoriet. Det vil også si at det vil være uventet at det oppstår store endringer i en stamme i løpet av et utbrudd av vintersår.

6.2.1 Sammenlikning av *gyrB*- sammenstilling og MLVA

Hovedsakelig gir VNTR- analysen en høyere grad av oppløsning enn sekvensanalysen, noe som ikke er uventet, da TR-sekvenser kan ha en høy mutasjonsrate og det omvendte ofte er tilfelle for husholdningsgener (Guidelines). Men VNTR-analysen gir også grupper som er relativt homogene, spesielt har isolatene i den typiske gruppen (gruppe 1 i figur 14 og 15) lite variasjon. Disse stammene har utelukkende den typiske varianten av *gyrB*-genet (TYP), som i alle sekvensene er helt identiske, så foruten de kommende omtalte unntakene er det sterk korrelasjon mellom de to metodene i denne gruppen.

I isolatet NVIO 5482 (fra torsk), er *gyrB*-sekvensen 99,9 % identisk med den typiske gruppen, men er gruppert nær en annen gruppe (gruppe 3, figur 16) i VNTR-analysen. Tilsvarende har isolatet NVIO 7263 (fra regnbueørret) den typiske *gyrB*-sekvensen, men er en «singleton» i MLVA. Mulige årsaker til dette kan være horisontal genoverføring (rekombinasjon) eller forbyttning av prøver i laboratoriet, men det er interessant at begge stammene er isolert fra andre arter enn laks. Disse isolatene bør iallfall undersøkes igjen for å utelukke feil, og da *gyrB*-genet ikke ble sekvensert i alle stammene som ble undersøkt med MLVA kan det være av interesse å gjøre dette med flere av stammene, for å finne ut hvor vanlig eller uvanlig dette er.

Atypiske isolater danner en tydelig gruppering i *gyrB*-analysen (figur 7). I MLVA danner disse stammene ikke en egen gruppe. I UPGMA-dendrogrammet (figur 16) er isolatene i den atypiske *gyrB*-gruppen spredt jevnt, men alltid utenfor gruppen med typiske isolater. Selv om det finnes noen grupperinger av ensartede isolater, er det hovedsakelig svært heterogent utenfor den typiske gruppen. Undergruppene ATYP 3, ATYP 4, ATYP 5,1 som ble funnet ved *gyrB*-analysen korrelerer med grupperinger som ble funnet med MLVA. Med ett unntak (NVIO 4917), er grupperingen ATYP 1 også sammenfallende med VNTR-analysen. Utover dette er det ingen tydelig korrelasjon mellom de to metodene for de atypiske undergruppene.

6.3 Evaluering av MLVA som typingmetode; epidemiologi og populasjonsgenetikk

6.3.1 MLVA som epidemiologisk verktøy.

De tre tilfellene der det ble isolert *M. viscosa* (alle isolert fra laks) med identiske VNTR-profiler i både settefiskanlegg og anleggene fisken ble satt ut i, tyder på at analysen kan brukes til epidemiologisk sporing i enkelte tilfeller. Det er naturlig at det er det samme bakterieklonet som forårsaket sykdom både i settefiskanlegg og sjøanlegg. For å benytte en typingmetode til epidemiologisk sporing, er et viktig moment at det er lav sannsynlighet for å reisolere en identisk stamme fra et annet, urelatert utbrudd (van Belkum et al., 2007). Diversitetsindeksen for alle lokiene kombinert var 0,981, det vil si at det er 1,9 % sannsynlighet for at to tilfeldige utvalgte bakterier blir typet likt. I følge Van Belkum et al. (2007) er 0,95 en nedre grense for et optimalt typingsystem, så analysen utviklet her burde være tilstrekkelig til epidemiologisk bruk. Men det kan godt hende at isolater fra laks er for homogene til dette formålet. Diversitetsindeksen for isolater kun fra laks (som i studien er underrepresentert i forhold til forekomst av vintersår), og isolater kun fra den typiske gruppen, var henholdsvis 0,944 og 0,886. Med andre ord er det 5,6 % sannsynlighet for at isolatene fra settefiskanleggene og sjøanleggene likevel ikke er de samme klonene. Dette tallet kan også være større, avhengig av prevalensen av typiske isolater i forbindelse med vintersår i dag. Analysen vil derfor muligens ha en for lav diskriminatorisk evne til epidemiologisk typing av isolater fra utbrudd i oppdrettsanlegg med laks. Utenfor den homogene gruppen av typiske isolater hadde analysen muligens passet til epidemiologi. Men med tanke på den store

overvekt av laks som blir produsert i oppdrettsnæringen, og en tydelig overvekt av typiske isolater fra laks, er det ikke aktuelt å benytte den til det.

6.3.2 Populasjonsgenetikk

Virulensgrad ble hovedsakelig bestemt på bakgrunn av arkiverte journaler, elektroniske og i permer, med en ofte sparsom eller mangelfull anamnese (beskrivelse av kliniske forhold fra kunde eller veterinær på anlegget). Det er, i tillegg til subjektive tolkninger, også eventuelt bakenforliggende forhold, som mekaniske skader eller andre sykdommer på fisken, som er med på å gi usikkerhet rundt soliditeten av denne informasjonen. Den er et forsøk på å finne en tendens i resultatene og må *ikke* tolkes eller brukes som et fastsatt virulensnivå, som etter et smitteforsøk. Isolering av flere ulike stammer fra det samme utbruddet er også en faktor som kompliserer avgjørelsen av virulens. Det er i disse tilfellene godt mulig at det kun er en eller noen få av isolatene som er årsak til sykdommen, mens de andre har «hengt seg på» som sekundærinfeksjon. Likevel vil alle isolatene ha det samme virulensnivå på bakgrunn av anamnesen. Samtidig fanger ikke dette opp muligheten for at en stamme kan være virulent, men ikke ha hatt forutsetninger eller tid til å skape sykdom i isolasjonsperioden.

6.3.3 Klonalitet og vaksinasjon

Klonale komplekser, eller klonale grupper, er «en gruppe bakterieisolater med høy grad av likhet», (van Belkum et al. 2007), og kan i multilokusanalyser defineres basert på både enkelt- og dobbeltlokus varianter (van Belkum et al. 2007, Bionumerics manual). Det vil si at en gruppe isolater som innad har maksimalt henholdsvis ett eller to loki forskjellig fra minst ett annet medlem av gruppen defineres som et klonalt kompleks.

I denne studien ble kriteriet basert på enkeltlokusvarianter, og det ble med programmet Bionumerics v. 6.1 identifisert fire klonale grupper. Disse kan med relativt stor sikkerhet sies å være nært beslektet, og sannsynligvis komme fra samme klone. Å utvide kriteriet til dobbeltlokusvarianter gav svært store grupper, der medlemmene i noen tilfeller ikke hadde et eneste loki til felles. Derfor ansees dette kriteriet som for løst for denne VNTR-analysen. Det var derimot mer fruktbart å tilføre linjer som viser «inter-gren relasjoner» med kriteriet «maksimalt to forskjellige loki» (figur 14). Disse støtter de klonale grupperingene, og antyder også stammer som muligens kan inkluderes som del av et av de fire klonale kompleksene.

Som analysen av *gyrB*-genet viser, kan det være en stor genetisk variasjon mellom de typiske og atypiske stammene. Hvis denne variasjonen er representativ for en generelt høy genomisk variasjon, og dermed også variasjon mellom antigene epitoper, vil de klonale kompleksene være av betydning for utvelgelse av stammer til utvikling av nye vaksiner. Under utprøvingen av primersett til de enkelte TR- lokiene ble det gjennomsnittlig observert single PCR-produkter i prøvene fra 75 % av de typiske stammene, og kun 44 % av de atypiske. Det er ikke umulig at dette kommer av at bindingssetet for en eller begge primere er for ulikt, eller at området ikke finnes, noe som underbygger antakelsen om genetisk variasjon mellom de to gruppene.

Det ble identifisert fire grupper med MLVA som antakelig er klonale grupper:

I den største gruppen (gruppe 1) er de typiske *M. viscosa*, som har en sterk artsspesifisitet hos laks. I tillegg til mange norske isolater, fra 1988 til 2011, fra Vest-Agder til Troms, er de skotske og færøyske isolatene i denne gruppen. Denne gruppen ser ut til å være virulent, og består hovedsakelig av stammer som var involvert i utbrudd av vintersår.

I gruppe 2 er det kun fem isolater, alle fra regnbueørret, og alle, bortsett fra et isolat fra Hordaland, er fra Møre og Romsdal. I tillegg er det syv isolater fra regnbueørret som grupperer seg nært denne gruppen. Selv om disse kun er dobbeltlokusvaianter er det godt mulig at en eller flere av disse hører til den samme klonale gruppen. Denne «utvidede gruppe 2» består også eksklusivt av isolater fra regnbueørret, og har virulensgrad 1 og 2, eller har ikke fått designert virulens. Alle isolatene i undergruppe 3 blant de atypiske stammene i *gyrB*-analysen (figur 7, ATYP3), befinner seg i blant disse, noe som støtter denne tolkningen. Av de 28 isolatene fra regnbueørret som ble analysert med MLVA i denne studien er 25 fra Møre og Romsdal, så det er vanskelig å foreta antakelser om geografisk distribusjon av denne gruppen. Men siden et av isolatene er fra Hordaland, er det ikke en gruppe som eksklusivt finnes i Møre og Romsdal. De norske isolatene fra regnbueørret isolert fra 1999 til 2011 det ble ikke funnet eldre isolater fra regnbueørret i bakteriedatabasen ved NVIO. Lillehaug et al. (2003) rapporterte også 1999 som det første året der vintersår ble diagnostisert hos regnbueørret i Norge. Regnbueørret er opprinnelig fra det vestlige Nord-Amerika, og har blitt introdusert i Europa fra 1880. I Norge er den blant annet introdusert som oppdrettsfisk (Regnbueørret, 2014). Det kan derfor ikke ha vært populasjoner av *M. viscosa* i Norge som er

spesialisert på denne arten som vertsorganisme før den ble introdusert. Da sykdommen ikke ser ut til å forekomme utenfor Nord-Atlanteren (Colquhoun og Lillehaug, 2014), er det også lite sannsynlig at denne gruppen *M. viscosa* ble introdusert sammen med regnbueørret. Oppdrett av denne arten hadde også en sterk økning i perioden 1994 til 2000, fra 6,3 til 28,9 millioner utsatte fisk (Fiskeridirektoratet, 2014). Disse faktorene kan være årsaken til det relativt sene innslaget av vintersår som et problem ved oppdrett av regnbueørret, sammenliknet med laks. Selv om det er vanskelig å få innsyn i hva vintersårkomponenten i dagens norske vaksiner består av (Colquhoun og Lillehaug, 2014), er det hovedsakelig inaktiverte bakterier fra den typiske gruppen (gruppe 1) som er vintersårkomponenten i vaksinene (D. J. Colquhoun, pers. komm., 21.11.14). Denne gruppen av *M. viscosa* ser ikke ut til å være involvert i utbrudd av vintersår hos regnbueørret. Så til utvikling av en vaksine spesielt til regnbueørret ville det vært naturlig å se nærmere på en av stammene i gruppe 2.

Den nest største grupperingen (Gruppe 3) inneholder også kun lakseisolater.

Her er sju av åtte isolater satt til 1 eller 2 i virulensnivå, så denne gruppen ser også ut til å være sykdomsfremkallende. De norske isolatene er fra 2003 til 2011, og kommer fra Rogaland til Troms. Den islandske stammen i denne gruppen, NVIO 6220 (K56), har opprinnelse fra Nord-Island, fra år 2000 eller tidligere, og danner en klade sammen med tre andre isolater med samme geografiske opprinnelse i studien med ALFP som ble presentert av Benediktsdottir et al (2000). Dette, og et norsk isolat, NVIO 4731, som er de eneste fra gruppe 2 som også er inkludert i *gyrB*-analysen, grupperes der i den atypiske undergrupperingen ATYP 5,1 (figur 7), som kun inneholder disse to isolatene. VNTR-profilene til disse stammene er også identiske. I studien av Karlsen et al. (2014b), ble stammene også gruppert likt etter tilstedeværelse av antatte virulensgener. Kun det norske av de to isolatene har evnen til å produsere syre fra mannose (Grove et al. 2010), men de øvrige likhetene gjør det vanskelig å forkaste muligheten av et felles klonalt opphav for denne gruppen, og at det har forekommet en spredning mellom Norge og Island.

Blant fjorten isolater fra forskjellige anlegg med laks fra vinteren 2011 så er fem i gruppe 3, det vil si at halvparten av gruppen er isolert dette året. I tillegg er alle, unntatt den islandske stammen, fra 2003 eller nyere. Til sammenlikning består den typiske gruppen av 36 isolater, der seks av disse er isolert i 2011, det vil si 1/6 av gruppen. Seksten av disse isolatene er fra 2003 eller nyere.

Denne gruppen kan representere en ny, atypisk klonal ekspansjon av stammer som er spesialisert på laks. Dette kan være et resultat av at vaksinen hovedsakelig har beskyttelse mot de typiske klonene, og at det er i ferd med å etableres en ny populasjon av *M. viscosa* med vertsspesifisitet hos laks, som vaksinen har dårligere beskyttelse mot. Hvis bakterier fra denne gruppen er i ferd med å bli en viktig medspiller i vintersårproblematikken i Norge, vil det i fremtiden være naturlig å vurdere å bruke en stamme fra denne gruppen, i tillegg til den som allerede finnes, som vintersårkomponent i vaksiner til oppdrettslaks.

I gruppe 4 er det fem isolater fra tre forskjellige fiskearter, og det er ikke like tydelige indikasjoner på virulensgrad som i de andre gruppene. Det er heller ikke korrelasjon med *gyrB*-undergrupperingene, som i gruppene over. Hvilken rolle denne gruppen spiller i forbindelse med vintersår er uklar, og det må definitivt gjøres flere undersøkelser før dette kan tolkes.

Nylig publiserte resultater fra smitteforsøk utført av Karlsen et al. (2014b) viser at en stamme fra den typiske gruppen (NVIO 3632, rekultivert som NVIO 7785 i denne studien) er svært virulent, og forårsaker høy mortalitet og kroniske sår under smitteforsøk. En stamme fra gruppe 2, NVIO 5450, forårsaket lavere dødelighet men også kroniske sår. Så patogenesen hos disse to gruppene ser ut til å være svært forskjellig.

Det ble funnet flere løse grupperinger og «singletonisolater» som hadde lav grad av likhet med andre grupper. Blant disse er det en tendens til å ha en lav virulensgrad, noe som er mest tydelig i MST-dendrogrammet i figur 15. Det fra tidligere kjent at det finnes avirulente kloner av *M. viscosa* (Benediktsdottir et al., 2000, Bjornsdottir et al., 2011). Det er typisk for bakterier som har frittlevende stadier å ha mange gener, mens obligat patogene bakterier normalt har færre gener (Moran, 2002). *M. viscosas* genom består av ca 4800 gener, noe som taler for at den sannsynligvis ikke er spesialisert som et patogen. At det finnes avirulente stammer kan gjenspeile en del av den naturlige floraen av bakterier i Nord-Atlanteren fra før oppdrettsnæringen la forholdene til rette for at enkelte kloner som allerede var virulente eller spesialiserte seg som patogene økte i antall. I sammenheng med utbruddene som er beskrevet nedenfor gir dette mening, da fisk som er svekket av vintersår forårsaket av *M. viscosa*, også kan være det rette miljøet for lavvirulente *M. viscosa*.

6.3.4 Utbruddsprofiler

Det ble undersøkt flere isolater fra enkelte anlegg, med hensikt å se på utbruddsprofiler. Noen av disse anleggene hadde ikke indikasjoner på utbrudd av vintersår, men *M. viscosa* ble isolert. Disse ble ikke anvist i UPGMA-dendrogrammet, da den epidemiologiske betydningen ikke er like viktig, samt for å gjøre figuren mer oversiktlig. I to av disse anleggende var det isolater med tre forskjellige VNTR-profiler. Dette kan tyde på at *M. viscosa* er i stor grad til stede i miljøet, og at den kan opptre opportunistisk. I tre anlegg ble det også funnet isolater som var identiske.

De følgende observasjoner er fra UPGMA-Dendrogrammet i figur 16 der anleggskoder er satt inn.

Alle anleggene beskrevet her er fra oppdrettsanlegg med regnbueørret, med unntak av et anlegg for laks, K1-08.

Det ble isolert to stammer fra hvert av tre anlegg der virulensnivået var satt til 1. I anlegget F1-08 er de to isolatene identiske, mens de er svært ulike i et annet (D4-08). At isolatene er identiske, er ikke uventet. De urelaterte isolatene i D4-08 kan tyde på at det pågår en koinfeksjon, enten med to eller flere stammer som er virulente, eller både virulente og opportunistiske stammer. I anlegg K1-08 er begge isolatene i den typiske gruppen, men har forskjellig VNTR-profil. Ulikheten er én repetisjon ved to av lokiene. Dette ser ut til å være den mest vanlige endringen i VNTR-loki (Vogler et al, 2006), så en mulighet er at utbruddet er forårsaket av en stamme som har endret antall repetisjoner i to TR-loki under utbruddet. Den typiske gruppen har relativt lite variasjon og ser ikke ut til å endre seg mye til tross for geografiske og tidsmessige store avstander. Derfor er det nok en mer plausibel mulighet at konsentrasjonen av typiske *M. viscosa* i havet er høy under de rette omstendighetene, og at dette også er en koinfeksjon med to liknende stammer.

For isolater fra tre anlegg fra det samme området, D1, D2 og D3-04, er virulens satt til 1 i to av dem. I anamnesen for anlegget D3-04 stod det kun «sår», så virulensgraden kunne ikke bestemmes.

Det er mulig å tolke dette som et utbrudd med vintersår som har spredt seg mellom tre nærliggende anlegg. Men figur 17, som viser en oversikt over isolatene fra disse anleggene,

gjør situasjonen veldig uklar. Det er ingen kausal agens som utmerker seg ved å være tilstede i alle anleggene, og heller ingen isolater fra det samme anlegget som er identiske.

En mulig forklaring er at disse utbruddene i hovedsak kan ha kommet av miljøpåvirkninger. For eksempel kan en storm ha skadet mye av fisken og gitt flere forskjellige mer eller mindre virulente stammer grunnlag til å infisere fisken. En annen forklaring kan være at det her er en eller flere hovedpatogene stammer som har forårsaket utbrudd av vintersår, mens det samtidig «henger seg på» flere opportunistiske stammer fra miljøet. Selvfølgelig kan alle stammene være virulente, men det kan også være en blanding av virulente og avirulente stammer.

Anleggene D1-11 og D2-11 ble valgt ut fordi de har en relativt kort geografisk avstand, 1,2 km, og at det samtidig forekom utbrudd i disse med svært høy dødelighet med like symptomer (sår som perforerte til bukhulen). En kan forvente at det var den samme stammen som har spredd seg mellom anleggene. Analysen av isolatene viste derimot at de har veldig ulike VNTR-profiler. Isolatet fra anlegget D2-11 ligger i gruppe 2, mens det andre ikke hører til noen tydelig gruppe. Årsaken kan ha vært miljøforhold eller bakenforliggende sykdommer som har smittet mellom anleggene og gjort fisken mer disponibel, slik at to urelaterte kloner er årsak til utbruddene.

Men, som i flere andre anlegg der det ble isolert flere *M. viscosa* med ulike VNTR-profiler, kan dette ha vært tilfellet her også. Det er godt mulig at analyse av flere isolater fra disse anleggene ville avslørt en klon som er felles for begge anleggene, og som da sannsynligvis er hovedpatogenet.

6.3.5 Geografi

Benediktsdottir et al (2000) rapporterte om en tydelig geografisk oppdeling av isolater fra Island og Norge, etter analyse med AFLP og SDS-PAGE. Det er kun seks isolater fra Island i denne studien, men det samme mønsteret sees i resultatene fra MLVA: det er ingen islandske isolater i den typiske gruppen, og stammer fra sørvest, nord, og øst på Island er i tre forskjellige grupper (øst er ikke representert i deres studie). Som i deres studie, ble isolatet fra rognkjeks fra Sørvest-Island med lav virulens (F 57=Nvio 6222) gruppert adskilt fra de andre islandske stammene.

Det ble ikke funnet tilsvarende tegn på geografisk tilhørighet blant de norske stammene. Grunnet et lavt antall isolater fra andre land enn Norge, og at over halvparten av de norske

isolatene er fra Møre og Romsdal gjør det vanskelig å gi sikre konklusjonen om den geografiske utbredelsen av de forskjellige grupperingene. Det mest påfallende er kanskje at det ikke ble funnet hverken islandske eller canadiske isolater i den typiske gruppen, noe som også ble påpekt av Grove et al. (2010). I tillegg ble alle de norske isolatene, deriblant typestammen, i studien av Benediktsdottir et al. (2000) gruppert i en egen homogen klynge utenfor de islandske. Det kan bety at det ikke finnes typiske *M. viscosa* på Island og i Canada, noe som bør være av epidemiologisk betydning, men utvalget av stammer fra disse landene i denne studien er for lavt til å gi sikre konklusjoner.

6.4 Metodologi

6.4.1 Sekvensering

Det var til å begynne med vanskeligheter med å få PCR-produkt til sekvensering av *gyrB*-genet, men bytte fra DyNAzyme™ II DNA Polymerase til Taq DNA Polymerase medførte en markant forbedring i resultatene. Dette kan være på grunn av enzymenes kvalitet, enten fra leverandøren eller på grunn av attenuering ved bruk og oppbevaring. Det er også sannsynlig at bufferløsningen, som stadig krevde oppvarming for å fjerne emulsjonsdannelser, er årsaken. Til dels var det også dårlig kvalitet på kromatogrammene etter sekvenseringsanalyse med MegaBACE 1000™ sekvenseringssystem. Dette kan ha vært forårsaket blant annet av dårlig DNA-kvalitet. Det ble ikke gjort analyse av kvaliteten på DNA etter ekstraksjonen fordi apparatet til det formålet var ute av stand. Senere kunne dette ha blitt gjennomført, men ble ikke prioritert, da kvaliteten viste seg god nok til PCR for andre formål.

6.4.2 Utvikling av MLVA.

Det ble i denne studien utviklet en MLVA med seks forskjellige TR-loki, opprinnelig til en gelbasert metode. Denne ble overført til separasjon med kapillærelektroforese og primere med fluorescerende prober, noe som involverte bytte av flere av primerne for å tilpasse fragmentstørrelsene til DNA-markøren som ble brukt. I tillegg ble to TR-loki byttet ut på bakgrunn av resultater fra den gelbaserte metoden. I ettertid måtte et av disse lokiene (VNTR 27) fjernes, da den inneholdt en sammensatt repetisjon som skapte usikkerhet rundt oppbygningen av et fragment, slik at kun fem loki ble brukt videre i analysen.

Under utviklingen av en gelbasert metode ble flere forskjellige primerkombinasjoner utprøvd til multipleks PCR med minst seks forskjellige loki. Årsakene til at en kombinasjon av primere ikke ble brukt videre var mangel på PCR-produkter på et eller flere loki etter multipleks PCR, og overlapping og nærliggende PCR-produkter, fordi det kan gi usikkerhet rundt hvilket lokus et bånd på gelen representerte. Sistnevnte problemer unngås ved å benytte kapillærelektroforese med forskjellige fluorescerende prober. I tillegg er det lett å beregne antall repetisjoner ut fra fragmentstørrelsen, noe som medfører at det er lettere å gjennomføre analysen i andre laboratorier. Disse er hovedårsakene til at metoden ble overført, i tillegg til at automatiseringsprosessen gjør det mulig å kjøre et stort antall prøver samtidig.

6.4.3 Optimalisering av PCR

På grunn av splittede topper og ujevn mengde PCR-produkter i flere av prøvene etter analyse med kapillærelektroforese, ble flere endringer i PCR-oppsettet utprøvd. Blant annet «touchdown» PCR, endringer i primer- og templatkonsentrasjon, temperaturer, tid, og antall sykluser. Å redusere konsentrasjonen av både primere og DNA-templat gav en forbedring på den ujevne mengden av PCR-produkter. Det samme gjorde reduksjon av antall sykluser (fra 35 til 30) og forlenging av det siste elongeringstrinnet på 60 °C fra 30 til 60 minutter. Dette forbedret også problemet med splittotoper markant (figur 10). Endringene ble gjort samtidig i de samme prøvene, årsaken var å spare ressurser, men metodisk er det mangelfullt å endre to faktorer samtidig. Det kan derfor ikke sies hvilken endring som er årsak til forbedringene. Om tidsbruk for gjennomføring av analysen blir et tema, vil det lett kunne gjøres undersøkelser av hvilken endring, om ikke begge, som forårsaket denne forbedringen.

6.4.4 Analyse av data

Mobiliteten til PCR-produkter ved kapillærelektroforese er ikke kun bestemt av størrelsen på et fragment, men også komposisjonen av sekvensen (van Belkum et al. 2007). Det betyr at det ikke alltid er samsvar med molekylvektsmarkøren og fragmentene, så en konstant kan brukes for å beregne den ekte fragmentlengden fra den observerte. For enkelte loki endret denne differansen seg avhengig av fragmentlengden, og en funksjon basert på differansen på observert og ekte fragmentlengde i alle fragmentlengdene som ble analysert var mer nøyaktig. Det ble ikke foretatt retest på stammen NVIO 7817, som manglet et fragment, da det minimum skal være 16 prøver per analyse ved bruk av en 3130 xl Genetic Analyzer (ABI), og ingen flere prøver skulle på det tidspunktet analyseres. Dette kan eventuelt gjøres i ettertid.

6.4.5 Overføring til andre laboratorier

For at andre laboratorier skal kunne gjennomføre den tilsvarende analysen og kunne sammenligne resultatene, er det viktigste momentet å bestemme forskjellen mellom observert og sann fragmentlengde. Dette vil la seg gjøre ved å bruke utvalgte referansestammer med kjente fragmentlengder for å tilpasse analysen til de lokale laboratorieforhold. Det er også nødvendig at alle fragmentlengder som tidligere ikke er observert, karakteriseres ved direkte sekvensering, for å verifisere at tandemrepetisjoner er opphav til forskjeller i fragmentlengde.

6.4.6 S sammensatt repetisjon

Det ble etter sekvensering av TR-lokiene funnet en sammensatt repetisjon, det vil si to tandemrepetisjoner med ulikt repetisjonsmotiv med kort avstand imellom. Larsson et al. (2009) utviklet et forslag til nomenklatur for entydig å sette tall på VNTR-data med fokus på antall repetisjoner, og ikke fragmentstørrelse. Et lokus som ble omtalt i deres studie inneholdt en sammensatt tandem repetisjon på 33 og 27 basepar. Det var i deres tilfelle relativt lett å dedusere oppbygningen av fragmentet fra fragmentstørrelsen, da kombinasjonen av de to repetisjonslengdene ikke gir spesielt mange mulige fragmentlengder. I denne studien ble det observert en sammensatt repetisjon som bestod av 5*6 bp og 2*30 bp i lokuset VNTR 27 i to av stammene der lokuset ble sekvensert, i typestammen (NVIO 2033) og NVIO 7712. De øvrige stammene hadde én enhet av sekvensen på 30 bp, men mellom 4 og 13 kopier av 6 bp-repetisjonen. Da 30 er en multippel av 6 vil dette si at alle fragmenter lengre enn det som er forventet av 4*6 bp og 1*30 bp teoretisk kan ha minst 2 mulige varianter. Det viste seg at dette var tilfelle for en av stammene (NVIO 7263), som ble sekvensert etter at dette ble oppdaget. Det ble observert den samme fragmentstørrelsen som typestammen i elektroferogrammet, men sekvensering viste at den genetiske oppbygningen var totalt forskjellig: 10*6 bp + 1*30 bp.

Det ble designet to primere som skulle hybridisere spesifikt i 2*30 -området, og ikke i sekvensene som bestod av kun én kopi, slik at varianten kunne oppdages ved kapillærelektroforese (fragmentene ville bli kortere). De ble testet ut i en vanlig PCR og gelelektroforese, men det viste seg at begge disse primerne gav produkt hos en stamme som ikke inneholdt 2*30 bp-repetisjonen (NVIO 7263). De aktuelle primerbindingsetene (figur 6, kapittel 4.7.10) inneholder mange likheter med sekvensområdet der de ikke skulle binde.

Dette har nok ført til feilhybridisering av primerne, men var noe som ikke kunne unngås på grunn av den lange repetisjonsenheter. Det ble derfor bestemt å utelate VNTR 27- lokuset, og bruke de 5 resterende lokiene i metoden.

En analyse av sammensatte mikrosatellitter (repeterende Enhet 1-6 bp) Chen et al. (2011a) foretok av 22 fullstendig sekvenserte genomer av forskjellige stammer *E. coli*, viste at mellom 1,75 og 2,43 prosent av repetisjonene hadde en eller flere ulike repetisjoner med 10 bp eller mindre avstand. Dette er mellom 340-712 ganger det som er forventet ut fra en tilfeldig fordeling. Da sammensatte repetisjoner ser ut til å forekomme langt oftere enn hva som forventes fra en tilfeldig fordeling av tandemrepetisjoner (Chen et al., 2011a), er dette noe som kan være nyttig å undersøke før utvikling av en MLVA. Dette kan gjøres ved å søke i områdene rundt identifiserte TR-lokier på nytt, med et dataverktøy som Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), uten å ha restriksjoner for lengden på repetisjonsenheter. Dette vil ikke forsikre at det ikke finnes flere enn en tandemrepetisjon ved lokuset hos andre isolater, men å utelukke det vil i det minste minke sannsynligheten for at dette problemet oppstår.

7 Konklusjon

Analysen av *gyrB*-genet viste to dypt adskilte og homogene grupperinger av isolater av *Moritella viscosa*: Typiske isolater nesten utelukkende fra laks og atypiske isolater fra forskjellige vertsfisk. Multilokus VNTR- analysen (MLVA) viste en høyere oppløsning: Typiske isolater ble her også gruppert tett i en klonal gruppe som korrelerte med sekvensanalysen, mens det ikke var en egen gruppe med atypiske isolater som korrelerte med den atypiske *gyrB*-gruppen. Det ble derimot funnet tre klonale grupper, og to av disse hadde tydelig vertsspesifisitet og virulens. En gruppe har sannsynligvis en sterk vertsspesifisitet til regnbueørret, i tillegg til en «ny» gruppe som ser ut til å ha laks som vert og muligens omgår beskyttelsen dagens vaksiner gir. De kan derfor være av interesse for utvikling av nye vaksiner mot vintersår, og videre studier burde involvere nærmere analyser av slektskapet mellom disse tre gruppene. Utbruddsprofilene viser at det ikke er uvanlig å isolere flere enn en variant av *M. viscosa* som ved utbrudd av vintersår. Dette kan tyde på at det er mange forskjellige kloner av *M. viscosa* tilstede når miljøforholdene er riktige, og at disse kan ha både en patogen og opportunistisk rolle. Det er også viktig å ta hensyn til dette ved studier av vintersår der *M. viscosa* er involvert, fordi et lavt antall isolater kan medføre at den eller de stammene som forårsaker sykdom ikke blir identifisert. Det er i denne studien en stor overvekt av isolater fra Møre og Romsdal, i tillegg til at den inkluderer et lavt antall stammer fra andre land enn Norge. Prøveutvalget bør definitivt utvides, for å se om det finnes geografisk korrelasjon innad i Norge, og å kunne trekke trygge konklusjoner om fordelingen av kloner mellom forskjellige land med kyst til Nord-Atlanteren. I tillegg kan det gjøres undersøkelser av flere utbrudd av vintersår, med et høyt antall isolater, for å se på sammensetningen av kloner i disse.

Tidligere genetiske analyser av *M. viscosa* som har gitt høy oppløsning, AFLP og PFGE, viser resultater som korrelerer godt med de som presenteres her (Benedikstdottir et al., 2000, Grove et al., 2010). AFLP og PFGE er i motsetning til MLVA tids- og arbeidskrevende, i tillegg til at det er vanskeligere å overføre gelbaserte metoder mellom laboratorier. MLVA-metoden som ble utviklet her er relativt rask å utføre etter isolering av bakterien, er portabel mellom laboratorier med det rette utstyret, og gir en høy oppløsning. Det er bør arbeides videre for å vurdere om oppløsningen er tilstrekkelig for epidemiologisk typing av isolater fra laks, men som et populasjonsgenetisk verktøy gir den nyttig informasjon.

8 Referanser

- ABI. (2008). Different effects of pcr inhibitors in multiplex SRT Assays. *www.3appliedbiosystems.com*
- ABI. (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide, Second Edition. *www.3appliedbiosystems.com*.
- Applied maths. (2004). I: Bionumerics manual. *www.applied-maths.com*
- Benediktsdóttir, Helgason & Sigurjónsdóttir. (1998). *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *Journal of Fish Diseases*, 21 (1): 19-28.
- Benediktsdóttir, E. & Heidarsdóttir, K. (2007). Growth and lysis of the fish pathogen *Moritella viscosa*. *Letters in applied microbiology*, 45 (2): 115-120.
- Benediktsdóttir, E., Verdonck, L., Spröer, C., Helgason, S. & Swings, J. (2000). Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (2): 479-88.
- Bichara, M., Wagner, J. & Lambert, I. (2006). Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 598 (1): 144-163.
- Bjornsdóttir, B., Gudmundsdóttir, T. & Gudmundsdóttir, B. (2011). Virulence properties of *Moritella viscosa* extracellular products. *Journal of fish diseases*, 34 (5): 333-343.
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blöcker, H. & Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (11): 3746-3750.
- Bruno, D., Griffiths, J., Petrie, J. & Hastings, T. (1998). *Vibrio viscosus* in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland: field and experimental observations. *Diseases of aquatic organisms*, 34 (3): 161-166.
- Chen, M., Zeng, G., Tan, Z., Jiang, M., Zhang, J., Zhang, C., Lu, L., Lin, Y. & Peng, J. (2011). Compound microsatellites in complete *Escherichia coli* genomes. *FEBS letters*, 585 (7): 1072-1076.
- Chen, M., Tan, Z., Zeng, G. & Zeng, Z. (2012). Differential distribution of compound microsatellites in various Human Immunodeficiency Virus Type 1 complete genomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (7): 1452-1457.
- Colquhoun, D., Hovland, H., Hellberg, H., Haug, T. & Nilsen, H. (2004). *Moritella viscosa* isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 24 (2): 109-114.
- Colquhoun, D. J. & Lillehaug, A. (2014). 15 Vaccination against Vibriosis. *Fish Vaccination*: 172.
- Colquhoun DJ, Hovland H, Hellberg H, Haug T, Nilsen H (2004) *Moritella viscosa* isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 24:109–114
- Colwell, R. R. & Morita, R. Y. (1964). Reisolation and emendation of description of *Vibrio marinus* (Russell) Ford. *Journal of bacteriology*, 88 (4): 831-837.
- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J. & White, B. A. (1993). Polymerase chain reaction. I: *PCR Protocols*, s. 1-29: Springer.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K. & Mattick, J. (1991). 'Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research*, 19 (14): 4008.

- Fiskeridirektoratet, (2014). www.fiskeridir.no. [Internett] Tilgjengelig på: <http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur/laks-regnbueoerret-og-oerret> [Funnet 17 November 2014].
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (11): 3872-3876.
- Greger, E. & Goodrich, T. (1999). Vaccine development for winter ulcer disease, *Vibrio viscosus*, in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 22 (3): 193-199.
- Grove, S., Wiik-Nielsen, C., Lunder, T., Tunsjø, H., Tandstad, N., Reitan, L., Marthinussen, A., Sørgaard, M., Olsen, A. & Colquhoun, D. (2010). Previously unrecognised division within *Moritella viscosa* isolated from fish farmed in the North Atlantic. *Diseases of aquatic organisms*, 93 (1): 51.
- Gudmundsdóttir, B. K. & Björnsdóttir, B. (2007). Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine*, 25 (30): 5512-5523.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59 (3): 307-321.
- Harth-Chu, E., Espejo, R. T., Christen, R., Guzmán, C. A. & Höfle, M. G. (2009). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 75 (12): 4079-4088.
- Hav. (2014, 15. juli). I Store norske leksikon. Hentet 10. august 2014 fra <https://snl.no/hav>.
- Hjeltnes B (red), 2014. Fiskehelse rapporten 2013. Veterinærinstituttet, Oslo
- Hunter, P. R., Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466.
- Haubold, B. & Hudson, R. R. (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics*, 16 (9): 847-849.
- Heidarsdóttir, K., Gravningen, K. & Benediksdóttir, E. (2008). Antigen profiles of the fish pathogen *Moritella viscosa* and protection in fish. *Journal of applied microbiology*, 104 (4): 944-951.
- Johansen R (red), 2013 Fiskehelse rapporten 2012. Veterinærinstituttet, Oslo
- Karlsen, C., Sørum, H., Willassen, N. P. & Åsbakk, K. (2012). *Moritella viscosa* bypasses Atlantic salmon epidermal keratocyte clearing activity and might use skin surfaces as a port of infection. *Veterinary microbiology*, 154 (3): 353-362.
- Karlsen, C., Ellingsen, A. B., Wiik-Nielsen, C., Winther-Larsen, H. C., Colquhoun, D. J. & Sørum, H. (2014a). Host specificity and clade dependent distribution of putative virulence genes in *Moritella viscosa*. *Microbial pathogenesis*, 77: 53-65.
- Karlsen, C., Vanberg, C., Mikkelsen, H. & Sørum, H. (2014b). Co-infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*), by *Moritella viscosa* and *Aliivibrio wodanis*, development of disease and host colonization. *Veterinary microbiology*, 171 (1): 112-121.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J. & Horikoshi, K. (1998). Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Applied and environmental microbiology*, 64 (4): 1510-1513.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S. & Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12): 1647-1649.

- Kim, H. J., Park, S., Lee, J. M., Park, S., Jung, W., Kang, J.-S., Joo, H. M., Seo, K.-W. & Kang, S.-H. (2008). *Moritella dasanensis* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic ocean. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58 (4): 817-820.
- Kofler, R., Schlötterer, C., Luschützky, E. & Lelley, T. (2008). Survey of microsatellite clustering in eight fully sequenced species sheds light on the origin of compound microsatellites. *BMC genomics*, 9 (1): 612.
- Larsson, J., Torpdahl, M., Petersen, R., Sørensen, G., Lindsted, B. & Nielsen, E. (2009). Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Eurosurveillance (Online Edition)*, 14 (15).
- Levinson, G. & Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*, 4 (3): 203-221.
- Legemiddelindustrien, 2012. *Tall og Fakta 2012*, Oslo, februar 2012: 07 Gruppen AS.
- Lillehaug, A., Lunestad, B. & Grave, K. (2003). Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture—a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Diseases of aquatic organisms*, 53 (2): 115-125.
- Lillehaug, A. (2014). 12 Vaccination Strategies and Procedures. *Fish Vaccination*: 140.
- Lindstedt, B.-A., Brandal, L. T., Aas, L., Vardund, T. & Kapperud, G. (2007). Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *Journal of Microbiological Methods*, 69 (1): 197-205.
- Lindstedt, B.-A., Torpdahl, M., Vergnaud, G., Le Hello, S., Weill, F., Tietze, E., Malorny, B., Prendergast, D., Ghallchóir, E. N. & Lista, R. (2013). Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012.
- Lindstedt, B. A. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26 (13): 2567-2582.
- Lunder, T. (1990a). *Vintersår*: I: T. Poppe, red. Fiskehelse, Sykdommer, Behandling, Forebygging. Bergen: John Grieg Forlag. 304-305 s.
- Lunder, T., Evensen, Ø., Holstad, G. & Hastein, T. (1995). «Winter ulcer» in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of aquatic organisms*, 23 (1): 39-49.
- Lunder, T., Sørum, H., Holstad, G., Steigerwalt, A. G., Mowinckel, P. & Brenner, D. J. (2000). Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (2): 427-50.
- Madigan, M. T. (2005). *Brock Biology of Microorganisms, 11th ed*: SciELO Espana.
- Nogi, Y., Kato, C. & Horikoshi, K. (1998). *Moritella japonica* sp. nov., a novel barophilic bacterium isolated from a Japan Trench sediment. *The Journal of general and applied microbiology*, 44 (4): 289-295.
- Moran, N. A. (2002). Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell*, 108 (5): 583-586.
- Nogi, Y. & Kato, C. (1999). Taxonomic studies of extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench and description of *Moritella yayanosii* sp. nov., a new barophilic bacterial isolate. *Extremophiles*, 3 (1): 71-77.
- Nyrén, P. (2007) The history of pyrosequencing *Methods Mol Biol.* 373:1-14.

- Olsen, A.B., Alarcon, M., Biering, E., Colquhoun, D., Dale, O.B., Falk, K., Fritsvold, C., Grøntvedt, R., Hansen, H., Hellberg, H., Heuch, P.A., Hjeltnes, B., Jensen, B.B., Johansen, R., Lie, K.-I., Mejdell, C., Nilsen, H.K., Poppe, T., Skjelstad, H.R., Sviland, C., Taksdal, T., Thoen, E., Vågnes, Ø., Ørpetveit, I., 2012. Fiskehelse rapporten; Helsesituasjonen hos laksefisk; 2011. Veterinærinstituttet, Oslo
- Olsen, A. B., Nilsen, H., Sandlund, N., Mikkelsen, H., Sørum, H. & Colquhoun, D. (2011). Tenacibaculum sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms*, 94 (3): 189-199.
- Regnbueørret. (2012, 20. august). I Store norske leksikon. Hentet 17. november 2014 fra <https://snl.no/regnbue%C3%B8rret>.
- Rychlik, W. (1993). Selection of primers for polymerase chain reaction. I: *PCR Protocols*, s. 31-40: Springer.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* (London) 163:688
- Tandem Repeat Sequences (1999). I Medical Subject Headings, Hentet 5. Januar 2014 fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&term=Tandem+Repeat+Sequences>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30 (12): 2725-2729.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463-5467.
- Schwartz, H. & Guttman, A. (1995). *Separation of DNA by capillary electrophoresis*: Beckman.
- Smith, P. (1988). Vaccination against vibriosis. *Fish vaccination*: 67-84.
- Snieszko, S. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *Journal of Fish Biology*, 6 (2): 197-208.
- Tunsjø, H. S., Paulsen, S. M., Mikkelsen, H., L'Abée-Lund, T. M., Skjerve, E. & Sørum, H. (2007). Adaptive response to environmental changes in the fish pathogen *Moritella viscosa*. *Research in microbiology*, 158 (3): 244-250.
- Tunsjø, H. S., Paulsen, S. M., Berg, K., Sørum, H. & L'Abée-Lund, T. M. (2009). The winter ulcer bacterium *Moritella viscosa* demonstrates adhesion and cytotoxicity in a fish cell model. *Microbial pathogenesis*, 47 (3): 134-142.
- Tørud, B. & Håstein, T. (2008). Skin lesions in fish: causes and solutions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50 (Suppl 1): S7.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Steven, S. E., Ohwada, K. & Colwell, R. R. (1998). A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russell 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. *FEMS microbiology letters*, 165 (2): 373-378.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. & Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57 (12): 2823-2829.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L. & Verbrugh, H. (1998). Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (2): 275-293.
- van Belkum, A. (2007). Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49 (1): 22-27.

- van Belkum, A., Tassios, P., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N., Fussing, V., Green, J., Feil, E. & Gerner-Smidt, P. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 13 (s3): 1-46.
- Vogler, A. J., Keys, C., Nemoto, Y., Colman, R. E., Jay, Z. & Keim, P. (2006). Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of bacteriology*, 188 (12): 4253-4263.
- Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J. & Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (8): 1846-1850.
- Xu, Y., Nogi, Y., Kato, C., Liang, Z., Rüger, H.-J., De Kegel, D. & Glansdorff, N. (2003). *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53 (2): 533-538.
- Qiagen. (2008). QIAGEN® Multiplex PCR Handbook. www.qiagen.com

Vedlegg 1. Tilleggstabeller

Tabell 1. Primere anvendt i studien, navn, sekvens, hybridiseringstemperatur (T_m), og leverandør.

Primernavn	Sekvens (5'-3')	T _m (°C, Breslauer et al 1986)	Leverandør
	VNTR-primere		
<i>M.viscosa</i> _VNTR_1_R	CAAAAACAAATGAAACCCGTTA	58,93	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_1_R#2	TAGGTGTATACCAGACAAAAACAAATG	59,69	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_2_L	TGTTCACTCATACAAACAACCTCA	59,58	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_2_R	CGTTTGAGTGAGGGGCTACT	59,35	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_2_R#2	CAAATGAAACCCGTTAATAATCAGT	60,59	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_2_R#3	GAATAACTGGAGCTGGTAATTAAGTAG	59,56	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_3_L	TGTACCGCCATTAGCAATCA	60,10	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_3_L#2	TGGGCTGTGTGGAAAATGT	59,95	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_3_R	GCAGCAACTCCAACCTCAA	59,98	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_3_R#2	GTCAAAGCAACTGACCCAAAT	59,09	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_4_L	TGTCAATATGTATGCCTTTCGTG	59,90	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_4_R	TGGATGAAAAGTTTAAAGTGTGTGT	59,07	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_5_L	CCGTTTATATGGGATAATTGACG	60,62	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_5_R	AGCCTGCTGAGCATTACAGAT	60,13	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_6_L	TCCAGGGGGCATTCTTTAAT	60,63	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_6_L#2	TCCAGGGGGCATTCTTTAATAA	61,76	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_6_L#3	CCAGGGGGCATTCTTTAATAA	60,15	Applied Biosystems
<i>M.viscosa</i> _VNTR_6_R	TTTGAGCCCCCTCTAAATCA	59,64	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_7_L	TTACGCATTCAAATTCACACA	58,75	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_7_R	CGGTAACATTGGTGCCAGTA	59,46	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_8_L	CCGTAAATGTGCGGCTATAA	58,72	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_8_R	CCCTCCTTACAAACACTGCAT	60,40	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_9_L	AGCCGAATTTCCACATCAC	59,94	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_9_R	CGCGGTAGCTGAAAATCACT	60,41	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_10_L	TTCGCATTACAATCGTCCAC	59,84	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_10_R	TAGAGCGCGACCTTCTCTC	59,86	TAG Copenhagen A/S
<i>M.viscosa</i> _VNTR_11_L	GGAAACAAACTCCGTGAGGA	60,09	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_11_R	CGTGAATTGGTGAAACGAGA	59,69	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_12_L	CCTTCATCTAGTTTTGATAATTGAGC	58,87	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_12_R	CAGTCCCCTGCTATGAATC	59,51	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_13_L	AAGGACAGGTTGTGAAACCA	58,03	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_13_R	GCCATCAAGATCTGACTTTGG	59,69	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_14_L	TTGCCATTGCAATTCCTTCT	59,65	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_14_R	ACTGAAGCGTCCATCGGTAT	59,58	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_14_R#2	CACAGAAATGCCGTTTGTA	59,58	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_15_L	CGCATTAGATTTAGGGCAATC	58,73	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_15_L#2	ATTACGGATGAATTGCTAAAACG	59,45	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_15_R	CGGCATACCTTATCAAGCAA	58,79	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_15_R#2	ACCTTTTGGGACGATTACGA	59,43	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_15_R#3	TACGCACTACACGGCCAATA	60,15	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_16_L	AAGGGGATGAATAAGTGATAGAGG	58,96	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_16_R	CTCGGGATTCTGAGGTTCAA	60,19	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_17_L	GTCATCGGTGATGTGGTGAA	60,39	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_17_R	AACCCGACTAGCACCCTA	59,62	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_17_R#2	CGCACGCCAAACATFACTT	59,71	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_17_R#3	GACACTATTTTCATAACCCCGACTA	59,95	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_17_R#4	GACGATAGCAGGCGATGAC	59,37	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_17_R#5	GAATTTTGGGGACGATAGCA	59,90	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_18_L	GGAAGAAAGGGTGTGGTATC	59,74	Invitrogen
<i>M.viscosa</i> _VNTR_18_R	GGTTTCAGCTGTTTCACTGC	58,50	Invitrogen

(Tabellen fortsetter neste side)

Tabell 1. Fortsettelse fra forrige side.

Primernavn	Sekvens (5'-3')	Tm (°C, Breslauer et al 1986)	Leverandør
VNTR-primere			
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	GGGCTTGTTCAATGAAAGCA	61,15	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_19_R</i>	AACACCGAGCAATCAGATCC	60,08	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	AATCAGAGATCGACGTGCAA	59,40	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_20_L</i>	ACAACCGGTACCGCAATAAG	59,88	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#2</i>	AATTGGTTGGGTGTGATTCAT	59,02	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#3</i>	CCTAAATTGGTTGGGTGTGATT	59,98	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	TCGTGATCTACGCCACTTCC	59,35	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_21_L</i>	GTTGATAGCTCGTTCGTTTGC	59,90	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_21_R</i>	CACCTGATAGTCGCGTTGC	60,43	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_25_L</i>	GGCCCCGAGTAAAGTCAAAGA	59,31	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_25_R</i>	GCAATTGATTCTCGTCCGTTA	60,09	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27_L</i>	CAGCCTTAACCCATTGCTGT	60,13	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27_L#2</i>	CCCTTGTTGTCCCGACTTAC	59,45	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27_R</i>	CTAAACCGGTGCCGATAAAA	59,96	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27_R#2</i>	TGCGTGGCGTAGTAATCAAG	59,90	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_28_L</i>	AAACCAAGCTGGTGTGTGCC	60,01	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_28_R</i>	GACACCAAGGCACGCATAAT	60,92	Invitrogen
Fluorescensmerkede primere til VNTR			
NED- <i>M.viscosa_VNTR_15_R</i>	CGGCATACCTTATCAAGCAA	58,79	Applied Biosystems
NED- <i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	TCGTGATCTACGCCACTTCC	59,35	Applied Biosystems
VIC- <i>M.viscosa_VNTR_27R</i>	CTAAACCGGTGCCGATAAAA	59,96	Applied Biosystems
VIC- <i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	TTTGAGCCCCCTCTAAATCA	59,64	Applied Biosystems
FAM- <i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	CACAGAAATGCCGTTTGTA	59,58	Applied Biosystems
FAM- <i>M.viscosa_VNTR_21_R</i>	CACCTGATAGTCGCGTTGC	60,43	Applied Biosystems
Primere til sekvensering av VNTR-loki			
<i>M.viscosa_VNTR_14_seq_L</i>	CCTATATATCCGGCACCACCT	60,07	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_15_seq_R</i>	TTCAGATGGCAAGTCTTTGGT	59,73	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_21_seq_L</i>	GACTGTGCACATAACCGCTAA	60,15	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_21_seq_R</i>	GCAAAGTAATGCTGCGAGTG	59,64	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27_seq_L</i>	CCCTTGTTGTCCCGACTTAC	59,45	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27_seq_R</i>	AAGCACCCACTAGGCCATTA	59,59	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_6_seq_L</i>	TTCAGCGAGAATCAAAAGAGG	59,58	Invitrogen
Primere til Sammensatt repetisjon			
<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#1</i>	TCTCGAAAGCAAAACCAGTTG	60,41	Invitrogen
<i>M.viscosa_VNTR_27Rcomp#2</i>	TTGTTGCCAAAGTCTCGAAAG	60,41	Invitrogen
Primere til sekvensering av <i>gyrB</i>			
<i>MoritellaGyrB1_L</i>	TGTCTGAAAATAATTACGACTCTCAA	59,66	
<i>MoritellaGyrB1_R</i>	CACWACACCGTGTAACCA	A=60,32,T=56,96	T=56,96
<i>MoritellaGyrB2_L</i>	CGGTGTWGGTGTCTGTGTTG	A=56,67,T=60,04	T=60,04
<i>MoritellaGyrB2_R</i>	AAACCATCGTTCCTCAT	60,38	
<i>MoritellaGyrB3_L</i>	GGAACGATGGTTTCCAAGAA	59,91	
<i>MoritellaGyrB3_R</i>	CAGCAGAGTCACCTCCACA	60,02	
<i>MoritellaGyrB1_L#2</i>	AAGCATTAGCGGGTCATTGT	59,6	
W=A/T			

Tabell 2. VNTR-loki som ble sekvensert, og stammenummer.

VNTR 21	VNTR 14	VNTR 6	VNTR 27	VNTR 20	VNTR 15
NVIO 2033	NVIO 2033	NVIO 2033	NVIO 2033	NVIO 6834	NVIO 6224
NVIO 3979	NVIO 2989	NVIO 4547	NVIO 4547	NVIO 6224	NVIO 6222
NVIO 4547	NVIO 4679	NVIO 5168	NVIO 4731	NVIO 6185	NVIO 5507
NVIO 4711	NVIO 4692	NVIO 5204	NVIO 4869	NVIO 6054	NVIO 5450
NVIO 4870	NVIO 4731	NVIO 5450	NVIO 4889	NVIO 6050	NVIO 5351
NVIO 4918	NVIO 4870		NVIO 5168	NVIO 5450	NVIO 5204
NVIO 5450	NVIO 4889		NVIO 5433	NVIO 5352	NVIO 5168
NVIO 5473	NVIO 5168		NVIO 5450	NVIO 5351	NVIO 4917
NVIO 7828	NVIO 5204		NVIO 5482	NVIO 4917	NVIO 4731
NVIO 7866	NVIO 5351		NVIO 6159	NVIO 4547	NVIO 4692
	NVIO 5433		NVIO 7261	NVIO 2033	NVIO 4547
	NVIO 5450		NVIO 7263		NVIO 4131
	NVIO 6094		NVIO 7762		NVIO 2033
	NVIO 6539		NVIO 7712		
	NVIO 6540		NVIO 7828		
	NVIO 7261				
	NVIO 7827				
	NVIO 7860				

Tabell 3. Resultater etter kapillærelektroforese: Stammenummer, fragmentlengde og beregnet antall repetisjoner. Stammer med understrek ble ikke inkludert i analyse med programmet Bionumerics v. 6,1. Disse, og stammer med stjerne (*) er ikke med i analyse av diversitetsindeks eller koblingsulikevkt.

Stammenummer	Fragmentlengde (bp)					Antall repetisjoner				
	VNTR6	VNTR14	VNTR15	VNTR20	VNTR21	VNTR6	VNTR14	VNTR15	VNTR20	VNTR21
NVIO 1527	186,17	360,98	518,67	273,38	118,57	5	13	8	7	5
NVIO 2033	186,34	361,11	518,75	273,57	119,03	5	13	8	7	5
NVIO 2808	192,4	366,38	518,67	274	118,94	6	14	8	7	5
NVIO 2989	186,34	366,38	518,39	273,62	119,03	5	14	8	7	5
NVIO 3041	186,34	366,38	518,78	273,61	119,02	5	14	8	7	5
NVIO 3049	186,37	371,6	518,74	273,77	118,92	5	15	8	7	5
NVIO 3498	186,42	366,49	518,82	273,7	118,95	5	14	8	7	5
NVIO 3968	180,12	376,55	482,64	273,68	136,25	4	16	4	7	7
NVIO 3979	174,12	381,57	527,47	242,65	183,87	3	17	9	2	12
NVIO 3999	186,37	366,43	518,66	273,56	119,03	5	14	8	7	5
NVIO 4131	186,33	340,91	474	273,85	136,34	5	9	3	7	7
NVIO 4178*	186,44	376,78	518,74	273,68	119,16	5	16	8	7	5
NVIO 4179	186,4	376,56	518,72	273,62	119,13	5	16	8	7	5
NVIO 4397	186,25	361,14	518,74	273,52	118,87	5	13	8	7	5
NVIO 4480	186,36	376,78	518,78	273,69	119,11	5	16	8	7	5
NVIO 4547	167,91	335,59	598,28	242,37	98,78	2	8	17	2	3
<u>NVIO 4548</u>	168,12	335,72	598,75	242,62	99,08	2	8	17	2	3
NVIO 4679*	186,3	371,45	518,82	273,54	118,95	5	15	8	7	5
NVIO 4692	186,26	340,62	509,87	242,3	136,22	5	9	7	2	7
NVIO 4711*	168,11	351,14	527,75	242,71	109,48	2	11	9	2	4
NVIO 4714	186,51	371,47	518,63	273,64	119,1	5	15	8	7	5
NVIO 4731	167,91	350,77	527,78	242,46	109,13	2	11	9	2	4
NVIO 4743	186,49	371,74	518,85	273,84	119,15	5	15	8	7	5
<u>NVIO 4744</u>	186,51	371,75	518,73	273,83	119,18	5	15	8	7	5
NVIO 4869	167,95	340,73	598,28	242,59	99,19	2	9	17	2	3
NVIO 4870	180,38	427,61	491,7	273,98	146,37	4	26	5	7	8
NVIO 4889	186,51	310,17	509,88	242,78	127,73	5	3	7	2	6
NVIO 4910	174,19	356,02	500,4	242,46	136,49	3	12	6	2	7
NVIO 4917	180,31	376,76	536,63	303,95	119,19	4	16	10	12	5
NVIO 4918	180,36	361,29	482,5	273,79	156,12	4	13	4	7	9
NVIO 4920	180,3	361,29	482,51	273,87	156,08	4	13	4	7	9
NVIO 4957	180,31	376,69	536,63	303,78	119,12	4	16	10	12	5
NVIO 4958	180,33	366,55	482,62	273,86	146,26	4	14	4	7	8
NVIO 5168	192,32	381,64	554,42	242,33	109,15	6	17	12	2	4
NVIO 5204	174,04	355,85	500,63	242,27	127,47	3	12	6	2	6
NVIO 5351	180,14	345,66	545,53	315,93	136,26	4	10	11	14	7
NVIO 5352	180,09	345,61	545,57	309,71	136,29	4	10	11	13	7
NVIO 5355	186,46	356,13	518,7	273,79	119,22	5	12	8	7	5
NVIO 5433	167,79	325,38	509,72	242,32	98,79	2	6	7	2	3
NVIO 5443	186,41	376,78	518,65	273,77	119,15	5	16	8	7	5
NVIO 5450	180,39	376,92	482,8	274,01	136,5	4	16	4	7	7
NVIO 5471	192,35	340,62	554,75	242,33	118,88	6	9	12	2	5
NVIO 5472	168,1	335,72	N/A	242,49	99,06	2	8	N/A	2	3
NVIO 5473	180,37	356,03	518,67	242,64	202,16	4	12	8	2	14
<u>NVIO 5474</u>	192,53	340,79	554,47	242,64	119,2	6	9	12	2	5
<u>NVIO 5475</u>	192,57	340,74	554,5	242,56	119,19	6	9	12	2	5
NVIO 5482	167,87	361,26	545,84	242,45	109,18	2	13	11	2	4
NVIO 5507	192,46	350,9	563,43	242,59	119,15	6	11	13	2	5
NVIO 5683	180,06	355,87	482,48	273,7	145,95	4	12	4	7	8
NVIO 6050	180,44	356,28	482,74	285,97	146,43	4	12	4	9	8
NVIO 6054	180,28	356,06	482,5	291,71	146,25	4	12	4	10	8
NVIO 6094	192,5	417,55	536,55	242,57	109,44	6	24	10	2	4
NVIO 6124	180,33	381,77	482,6	273,78	127,69	4	17	4	7	6

(Tabellen fortsetter på neste side)

Tabell 3. Fortsettelse fra forrige side.

Stamnummer	Fragmentlengde (bp)					Antall repetisjoner				
	VNTR6	VNTR14	VNTR15	VNTR20	VNTR21	VNTR6	VNTR14	VNTR15	VNTR20	VNTR21
NVIO 6159	167,95	340,81	598,5	242,68	99,19	2	9	17	2	3
<u>NVIO 6160</u>	168	340,75	598,48	242,57	99,1	2	9	17	2	3
NVIO 6184	167,79	361,1	527,95	242,3	98,79	2	13	9	2	3
NVIO 6185	180,11	361,06	482,52	279,69	145,95	4	13	4	8	8
NVIO 6216	180,19	376,58	518,72	273,49	118,76	4	16	8	7	5
NVIO 6217	186,24	381,74	518,76	273,63	118,79	5	17	8	7	5
NVIO 6219	180,19	366,44	545,6	273,63	136,26	4	14	11	7	7
NVIO 6220	167,87	335,61	518,82	242,35	109,07	2	8	8	2	4
NVIO 6221	180,25	366,56	545,64	273,62	136,35	4	14	11	7	7
NVIO 6222	192,5	371,62	572,46	242,63	119,13	6	15	14	2	5
NVIO 6223	180,45	366,53	545,37	273,77	136,52	4	14	11	7	7
NVIO 6224	174,27	345,97	491,79	255,43	119,11	3	10	5	4	5
NVIO 6533	186,45	366,51	518,77	273,77	119,14	5	14	8	7	5
NVIO 6534	186,49	366,59	518,73	273,77	119,15	5	14	8	7	5
NVIO 6539	186,52	386,95	518,9	273,84	119,2	5	18	8	7	5
NVIO 6540	186,48	382,03	518,94	273,83	119,19	5	17	8	7	5
NVIO 6562	186,54	382,09	518,89	273,92	119,2	5	17	8	7	5
NVIO 6578	186,39	371,58	518,51	273,64	119,19	5	15	8	7	5
NVIO 6834	180,5	366,56	491,82	236,22	99,18	4	14	5	1	3
NVIO 7153	168,14	346,01	518,75	242,68	109,46	2	10	8	2	4
<u>NVIO 7154</u>	167,98	345,52	518,35	242,35	109,34	2	10	8	2	4
<u>NVIO 7192</u>	167,95	345,57	518,2	242,44	109,34	2	10	8	2	4
NVIO 7261	180,32	397,06	518,97	242,64	99,07	4	20	8	2	3
NVIO 7262	180,37	382,09	537,15	304,05	119,1	4	17	10	12	5
NVIO 7263	180,29	356,04	598,72	242,49	119,17	4	12	17	2	5
<u>NVIO 7264</u>	180,29	381,82	536,77	303,87	119,16	4	17	10	12	5
NVIO 7364	192,5	427,5	482,71	242,61	127,64	6	26	4	2	6
<u>NVIO 7365</u>	192,49	427,47	482,73	242,63	127,64	6	26	4	2	6
NVIO 7522	168	350,69	518,24	242,4	109,3	2	11	8	2	4
NVIO 7635	186,32	366,21	518,38	273,53	119,15	5	14	8	7	5
NVIO 7693	186,32	366,17	500,08	273,52	119,07	5	14	6	7	5
NVIO 7703	180,3	366,28	473,54	316,14	127,67	4	14	3	14	6
NVIO 7712	186,4	381,55	518,45	279,58	119,17	5	17	8	8	5
NVIO 7751	168,05	355,91	518,48	242,54	109,35	2	12	8	2	4
NVIO 7752	186,37	366,15	500,16	273,54	119,04	5	14	6	7	5
NVIO 7770	168,03	345,52	518,22	242,43	109,4	2	10	8	2	4
NVIO 7780	186,29	366,18	518,37	273,54	119,15	5	14	8	7	5
NVIO 7785	186,38	371,38	518,5	273,54	119,1	5	15	8	7	5
NVIO 7787	167,97	345,69	518,45	242,42	109,32	2	10	8	2	4
NVIO 7791	168,03	345,67	518,38	242,49	109,39	2	10	8	2	4
NVIO 7798	167,96	335,64	598,23	242,53	99,1	2	8	17	2	3
NVIO 7804	186,42	371,46	518,57	273,62	119,14	5	15	8	7	5
NVIO 7806	186,32	366,08	518,31	273,46	119,02	5	14	8	7	5
NVIO 7813	180,37	366,44	509,9	242,63	136,45	4	14	7	2	7
NVIO 7815	180,22	355,83	482,29	273,62	146,16	4	12	4	7	8
NVIO 7817	N/A	340,88	491,63	279,69	119,13	N/A	9	5	8	5
NVIO 7819	167,99	345,67	518,41	242,45	109,35	2	10	8	2	4
NVIO 7827	186,37	320,37	518,9	242,63	99,07	5	5	8	2	3
NVIO 7828	167,92	325,7	483,07	242,69	89,83	2	6	4	2	2
NVIO 7839	186,46	366,53	500,5	273,8	119,08	5	14	6	7	5
NVIO 7860	186,4	391,95	518,91	273,72	119,12	5	19	8	7	5
NVIO 7866	180,4	371,96	474,13	273,98	127,71	4	15	3	7	6

Vedlegg 2. Metode og resultater multipleks VNTR-analyse for agarose gel elektroforese

Primere, PCR-metoder, agarose gel elektroforese, brukt i utviklingen av en multipleks VNTR for agarose gel elektroforese, og resultatoversikt er gitt i de kommende tabellene. Om ikke annet er nevnt er PCR- oppsettet som beskrevet i kapitlet «materialer og metoder» med DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finnzymes, kapittel 4.4.2.1) eller QIAGEN® Multiplex PCR Kit (QIAGEN, innledende metode, kapittel 4.4.4.1). Resultat for bånd etter multipleks PCR er tolket etter det mest sannsynlige TR-lokuset båndet representerer. Forut for dette ble 20 TR-loki undersøkt ved PCR-amplifikasjon og agarose gel elektroforese (kapittel 4.7.3), og primere valgt ut på basisen av disse resultatene (kapittel 5.2.2). Nye primerkombinasjoner i forhold til foregående forsøk er i tabellene gitt i fet skrift. Primersekvens og hybridiseringstemperatur er gitt i tabell 1, vedlegg 1. Hvert forsøk har fått betegnelsen «gel 1- gel 13»

Tabell 1. Stammer brukt som DNA- templat hvis ikke annet er nevnt i de kommende tabellene.

Stamnummer	Bakterieart	Fiskeart
NVIO 2033	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 3999	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 4179	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 4731	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 4917	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 4958	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5168	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5433	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 5443	<i>Moritella viscosa</i>	Laks
NVIO 5450	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret
NVIO 5507	<i>Moritella viscosa</i>	Torsk
NVIO 5683	<i>Moritella viscosa</i>	Regnbueørret

Tabell 2. Metode og resultater gel 1 og gel 2.

Metode									Resultater		
Primere			Gel nr 1			Gel nr 2			Gel nr 1	Gel nr 2	
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse typestamme (bp)	PCR	Stammer (NVIO)	Gel-elektroforese	PCR	Stammer (NVIO)	Gel-elektroforese		2033	5433
<i>M.viscosa_VNTR_1_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R</i>	272	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#2</i>	136	Dynazyme	2033, 4917, 5507, 5683	2%, 14 cm (l) * 12 cm (br), 3,3 V/cm, 3 t	Hybridiserings-temperatur: 55 °C	2033, 5433	2%, 10 cm (l)* 6 cm (br), 6 V/cm, 1,5 t	Ingen bånd	Ingen bånd	Ingen bånd
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354							Ingen bånd	Bånd	Ingen bånd
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448							-	Bånd	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_3_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_3_R#2</i>	567							Ingen bånd	Ingen bånd	Ingen bånd
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608							Ett bånd, 5683	Bånd	Ingen bånd
Samtlige primere		136-608	Dynazyme, primer: 0,2 µM, dNTP: 320 µM	2033, 4917					Ingen bånd	Tilsvarende som over	Bånd VNTR 14. Svake bånd: 15, 16

Tabell 3. Metode og resultater gel 3.

Metode							Resultater
Primere			PCR		Gel nr 3		Gel nr 3
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse typestamme (bp)	Multipleks	Blokk	Stamme	Gel-elektroforese	Bånd
<i>Moritella_VNTR_2_L</i>	<i>Moritella_VNTR_2_R#2</i>	136	Dynazyme	Gradient PCR, 54.8 - 56.2 - 57- 57,7- 58,2 °C	NVIO 2033	2%, 15 cm (l) *25 cm (br), 4,2V/cm, 2,75 t	Kun VNTR 14, 15, 19, 1. Relativt likt alle temperaturer, sterkeste bånd ved 57 °C,
<i>Moritella_VNTR_1_L</i>	<i>Moritella_VNTR_1_R</i>	272					
<i>Moritella_VNTR_14_L</i>	<i>Moritella_VNTR_14_R#2</i>	354					
<i>Moritella_VNTR_19_L</i>	<i>Moritella_VNTR_19_R#2</i>	448					
<i>Moritella_VNTR_3_L</i>	<i>Moritella_VNTR_3_R#2</i>	567					
<i>Moritella_VNTR_15_L</i>	<i>Moritella_VNTR_15_R#2</i>	608					
Samtlige primere		136-608	Dynazyme, primer: 0,2 µM, dNTP: 320 µM				VNTR 14, 15, 19

Tabell 4. Metode og resultater gel 4 og gel 5. På grunn av en regnefeil ble primerkonsentrasjonen i gel 4 1/10 av tiltenkt.

Metode									Resultater	
Primere			Gel nr 4			Gel nr 5			Gel nr 4	Gel nr 5
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse typestamme (bp)	PCR	Stammer	Gel-elektroforese	PCR	Stammer	Gel-elektroforese	Stammer, bånd	Stammer, bånd
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#2</i>	136	Dynazyme, multiplex, primer: 0,034 µM, dNTP: 320 µM	Tabell 1, og <i>M. marina</i> og <i>M. japonica</i>	14 cm (l) * 12 cm (br), 4 V/cm, 2,25 t	Quiagen, innledende metode	Tabell 1	14 cm (l) * 12 cm (br), 4 V/cm, 2,5 t	0	0
<i>M.viscosa_VNTR_20_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	198							Kun <i>M. viscosa</i>	Alle stammer, men produktet fra disse primerne overlapper i størrelse
<i>M.viscosa_VNTR_1_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R</i>	272							0	
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354							Kun <i>M. viscosa</i> , svake bånd	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448							0	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608							0	Alle stammer

Tabell 5. Metode og resultater gel 6.

Metode					Resultater (bånd)	
Primere			PCR	Gel nr 6	Miltiplex, 6 primer-sett, 12 stammer	Miltiplex, 7 primer-sett
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse typestamme (bp)	Multiplex, Quiagen, stammer (NVIO)	Gel-elektroforese		
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	129	12 stammer, tabell 1, multiplex	2 %, 14 cm (l) * 12 cm (br), 4 V/cm, 2,5 t	Alle stammer	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_20_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	198			Alle stammer	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_1L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R</i>	295			0	0
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354			Alle stammer	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448			Alle stammer	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608			Alle stammer	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_3L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_3_R</i>	740	2033, 4917, 5507	-	0	

Tabell 6. Metode og resultater gel 7.

Metode						Resultater (bånd)		
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse tpestamme (bp)	PCR		Gel- elektroforese	mix 1	mix 2	Anmerkning
			Multiplex, Quiagen, stammer	Stammer (NVIO)				
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	129	x	x	2%, 10 cm (l) *6 cm (br), 6,7 V/cm, 1,25 t	Bånd	Bånd	I mix 1 manglet alle bånd for NVIO 4917
<i>M.viscosa_VNTR_20_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	198	x	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354	x	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608	x	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448	x	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_1_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R#2</i>	287	x	-		0	0	
<i>M.viscosa_VNTR_1_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R</i>	295	-	x		0	0	

Tabell 7. Metode og resultater gel 8.

Metode					Resultater	
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse tpestamme (bp)	PCR, templat	Gel- elektroforese	alle stammer	Anmerkning
<i>M.viscosa_VNTR_17_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_17_R#2</i>	128	Multiplex, Quiagen, 12 stammer, tabell1	2%, 14 cm (l) * 12 cm (br), 4 V/cm, 2,5 t	bånd	NVIO 4131: overlappende bånd fra disse primerne
<i>M.viscosa_VNTR_6_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186			bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_1_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R</i>	272			bånd	svake
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354			bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448			bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608			bånd	

Tabell 8. Metode og resultater gel 9.

Metode					Resultater	
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse tpeestamme (bp)	PCR, stammer	Gel- elektroforese	alle stammer	Anmerkning
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	129	Multiplex, Quiagen, 12 stammer, tabell 1, ikke NVIO 2033, dobbel konsentrasjon VNTR 1-primere	2 %, 14 cm (l) * 12 cm (br), 4 V/cm, 2,5 t	bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_6_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186			bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_1_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_1_R</i>	272			bånd, ikke 3999	svake bånd
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354			bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448			bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608			bånd	

Tabell 9. Metode og resultater gel 10.

Metode					Resultater
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse tpeestamme (bp)	Multiplex, Quiagen, stammer	Gel- elektroforese	Alle stammer
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	129	12 stammer, tabell 1	2 %, 14 cm (l) * 12 cm (br), 3,3 V/cm, 2,5 t	bånd
<i>M.viscosa_VNTR_6_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186			bånd
<i>M.viscosa_VNTR_17_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_17_R#4</i>	260			bånd
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354			bånd
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448			bånd
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608			bånd

I gel 10 (tabell 9) var det 6 PCR- produkt fra alle stammene, og det ble innhentet tilgjengelig DNA fra andre *M. viscosa* stammer ved NVIO, som ble analysert med den samme PCR- metoden som i gel 10, for å vurdere metoden videre. Stammer og resultater er gitt i tabell 10.

Tabell 10. Gel 11; 36 nye stammer som ble analysert med PCR- metode som gel 10. Her angis hvilke brønner PCR-produkt ble applisert og resultater for hver prøve. Gelen var 2,5 % agarose, 15 cm (lengde) * 25 cm (bredde), og ble kjørt ved 4,7 V/cm i 2 t.

Brønnummer (5µL)	Stammenummer (NVIO) / markør	Bakterieart	Resultat (antall bånd i agarosegel, anmerkn.)
1	O'generuler 50 bp		
2	1527	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
3	3968	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
4	4397	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
5	4679	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
6	4692	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
7	4869	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
8	5204	<i>M. viscosa</i>	Sannsynligvis 6 bånd, men to bånd overlapper og glir inn i hverandre (VNTR 19 og 14)
9	O'generuler 50 bp		
10	5351	<i>M. viscosa</i>	7 (uspesifikt produkt) bånd, svakt nederste bånd (VNTR 2)
11	5352	<i>M. viscosa</i>	6, svakt nederste bånd (VNTR 2)
12	5433	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
13	5471	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
14	5482	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
15	6216	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
16	6219	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
17	6220	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
18	O'generuler 50 bp		
19	6221	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
20	6222	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
21	6223	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
22	6224	<i>M. viscosa</i>	Sannsynlig 6 bånd, men overlapp mellom 3 bånd som går inn i hverandre (VNTR 19, 14 og 17)
23	6533	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
24	6534	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
25	6539	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
26	6540	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
27	O'generuler 50 bp		
28	6184	<i>M. viscosa</i>	5 bånd, mangler produkt fra VNTR 19
29	tom	tom	
30	6562	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
31	6578	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
32	5814	<i>M. marina</i>	1 bånd
33	O'generuler 50 bp		
34	6010	<i>M. japonica</i>	Ingen bånd
35	Negativ kontroll		Ingen bånd
36	2989	<i>M. viscosa</i>	Kun 5 bånd, mangler fra VNTR 2
37	4547	<i>M. viscosa</i>	Kun 5 bånd, mangler fra VNTR 2
38	5471	<i>M. viscosa</i>	Kun 5 bånd, mangler fra VNTR 2
39	5482	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
40	6185	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
41	6185	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
42	O'generuler 50 bp		
43	6217	<i>M. viscosa</i>	6 bånd
44	Negativ kontroll		

Tabell 11. Metode og resultater gel 12 A og gel 12 B. Fordi elektroforesen foregikk for lenge forsvant produkt fra VNTR-2 primere ut av gelen, derfor ble det kjørt to geler.

Metode									Resultater		
Primere			Gel 12 A			Gel 12 B			Gel 12 A		Gel 12 B
Fwd primer	Bwd primer	Forventet produktstørrelse typestamme (bp)	PCR	stammer	Gel-elektroforese	PCR	stammer	Gel-elektroforese	Bånd	Anmerkning	Bånd
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	136	Multiplex, Quiagen, 1,5x kons VNTR 2-primere	1527, 5351, 5352, 2989, 4547, 5471	2,5 %, 10*6 cm, 7,1 V/cm, 2,25 t	Multiplex, Quiagen, stammer, dobbel kons VNTR_2-primere	1527, 5351, 5352, 2989, 4547, 5471	2,5 %, 10*6 cm, 7,1 V/cm, 1,45 t	Alle stammer: 5 bånd, i tillegg et uspesifikt bånd i 5351 VNTR-2 primere ut	Fordi elektroforesen gikk for lenge gikk produkt fra VNTR-2 primere ut av gelen	Alle stammer: 6 bånd, i tillegg et uspesifikt bånd i 5351 (ved ca 275bp). Båndene fra VNTR2- primere er sterkere jfr tidligere metode
<i>M.viscosa_VNTR_6_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186									
<i>M.viscosa_VNTR_17_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_17_R#4</i>	260									
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354	Multiplex, Quiagen	5204, 6223, 6224, 6184					5 bånd: 5204, 6223, 6224, og 6184 manglet bånd fra VNTR19- primere		
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448									
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608									

Tabell 12. Metode og resultater gel 13. Det ble brukt to kombinasjoner av VNTR 20-primere, som indikeres i tabellen (mix 1 og mix 2).

Metode						Resultater (bånd)		
Fwd primer	Rev primer	Forventet produktstørrelse typestamme (bp)	PCR		Gel-elektroforese	mix 1	mix 2	Anmerkning
			Multiplex, Quiagen, stammer	Stammer (NVIO)				
<i>M.viscosa_VNTR_2_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_2_R#3</i>	129	x	x	2,5 %, x cm * x cm, 4V/cm, 2 t	Bånd	Bånd	Noe svake bånd VNTR 2- primere.
<i>M.viscosa_VNTR_6_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_6_R</i>	186	x	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#2</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	268	x	-		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_20_L#3</i>	<i>M.viscosa_VNTR_20_R</i>	272	-	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_14_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_14_R#2</i>	354	x	x		Bånd	Bånd	
<i>M.viscosa_VNTR_19_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_19_R#2</i>	448	x	x		Bånd, ikke NVIO 6184	Bånd, ikke NVIO 6184	
<i>M.viscosa_VNTR_15_L</i>	<i>M.viscosa_VNTR_15_R#2</i>	608	x	x		Bånd	Bånd	



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

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