



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2023
NMBU Veterinærhøgskolen

Kartlegging av bakterien *Capnocytophaga canimorsus* hos norske hunder

Isolation of *Capnocytophaga canimorsus* from
Norwegian dogs

Johanne Fjellså & Kaja Farsethås Ilbråten
Kull 2017

Veiledere Marina Aspholm & Yngvild Wasteson

Innhold

Forord.....	5
Sammendrag	6
Forkortelser	7
Definisjoner.....	8
Innledning	9
Bakgrunnen for studien.....	9
Generell risiko ved hundebitt.....	10
Informasjon om bakterien	10
Smittevei	12
Patogenese.....	12
Sykdom hos menneske.....	13
Kasusstudier	13
Kasus 1	13
Kasus 2.....	14
Kasus 3.....	15
Oppsummering av kasusrapporter	16
Formål.....	16
Materiale og metoder	17
Beskrivelse av studiepopulasjon.....	17
Inklusjonskriterier	17
Eksklusjonskriterier	17

Variabler	17
Rekruttering av hunder	18
Revidering av prosjektmål- og omfang.....	19
Prøvetaking	20
Beskrivelse av forberedende prosedyrer.....	20
Utsåing av svaberprøver og inkubering	20
Plukking av kolonier.....	21
Beskrivelse av biokjemiske tester.....	22
Katalase.....	22
Oksidase.....	23
ONPG.....	23
Indol	24
Karbohydratspalting.....	24
Aerob vekst	25
Gram-farging.....	26
Resultater	27
Diskusjon	32
Feilkilder	32
Utførelse av prøvetaking.....	32
Tidspunkt for prøvetaking.....	33
Utfylling av spørreskjema.....	34
Laboratoriearbeid.....	34

Resultater	36
Konklusjon	37
Takk til bidragsyttere	38
Summary	39
Referanser	40
Vedlegg	42
Vedlegg 1: E-post	42
Vedlegg 2: Informasjonsskriv	43
Vedlegg 3: Spørreskjema	44
Vedlegg 4: Oversikt over svar på spørreskjema	45
Vedlegg 5: Metadata til vedlegg 4	47
Vedlegg 6: Oversikt over resultater fra laboratoriet	48
Vedlegg 7: Metadata til vedlegg 6	52
Vedlegg 8: Flytskjema runde 1	53
Vedlegg 9: Flytskjema runde 2	54
Vedlegg 10: Flytskjema runde 3	55

Forord

I valg av fordypningsoppgave la vi vekt på at det skulle være et praktisk rettet prosjekt. Vi ønsket å fordype oss i et tema som er aktuelt i en klinisk hverdag som veterinær. I første omgang startet vi planlegging av et prosjekt som omhandlet effekten av probiotika i fjøsmiljøet hos kalver. Det skulle vise seg at dette var praktisk vanskelig å gjennomføre og i stedet ble et nytt prosjekt introdusert. Dette baserte seg på å undersøke forekomsten av bakterien *Capnocytophaga canimorsus* hos norske hunder. Vi var svært positive til at den nye oppgaven gav oss muligheten til å tilegne oss mer erfaring med laboratoriearbeid. I tillegg var det interessant å kunne fordype oss i et tema hvor det fremdeles mangler mye opplysninger. Det er ikke tidligere blitt utført noen undersøkelser om forekomsten av denne bakterien i Norge som vi kjenner til. Samtidig er det lite opplyst om den mulige faren for alvorlig human sykdom som kan oppstå ved bittskade fra hund som bærer den virulente varianten av bakterien. Vi har gjennom prosjektet fått arbeide med planlegging, prøveinnsamling, utforming av informasjons- og spørreskjema og laboratoriearbeid i et forsøk på å verifisere bakterien. Resultatet ble ikke som forventet, og vi har fått en mulighet til å tenke ut mulige årsaker og løsninger på problemene.

God lesing.

Sammendrag

- Tittel:* Kartlegging av bakterien *Capnocytophaga canimorsus* hos norske hunder
- Forfattere:* Johanne Fjellså og Kaja Farsethås Ilbråten
- Veiledere:* Marina Aspholm og Yngvild Wasteson, NMBU Veterinærhøgskolen, Institutt for parakliniske fag, faggruppe mattrygghet

Formålet med dette prosjektet var i utgangspunktet å kartlegge forekomsten av bakterien *Capnocytophaga canimorsus* hos norske hunder på Østlandet. Dette er en Gram-negativ stavbakterie som forekommer naturlig i munnhulen hos hunder og katter. Virulente stammer av bakterien kan gi alvorlig sykdom hos menneske. Det har blitt samlet inn totalt 86 svaberprøver fra munnhulen til hunder, i kombinasjon med utfylling av spørreskjema. Underveis i arbeidet på laboratoriet viste det seg å være flere utfordringer knyttet til dyrking og påvisning av denne bakterien. På grunn av begrenset tid endret formålet seg fra å kartlegge forekomsten av bakterien til å optimalisere protokollen for å påvise den. Metodene som ble brukt i denne protokollen inkluderer mikroaerofil dyrking på selektiv agar, etterfulgt av Gram-farging og videre biokjemiske tester for å verifisere bakterien. *C. canimorsus* skal være positiv for oksidase- og katalase-aktivitet, kunne fermentere maltose og laktose og positiv i en test for ortho-nitrophenyl- β -galaktopyranosid. Videre skal den være negativ for fermentering av raffinose og sukrose samt negativ i indol-test. Etter tre separate runder på laboratoriet ble ikke *C. canimorsus* påvist fra prøvematerialet. Dette skyldes mest trolig ikke at bakterien ikke forekommer i Norge, men heller problemer med å dyrke den i prosjektet. Mest sannsynlige feilkilder vurderes å være knyttet til oppbevaring av prøvemateriale og utvalg av kolonier til renkultur etter primærutsåing. Det kan allikevel ikke utelukkes at det negative resultatet skyldes lav forekomst av *C. canimorsus* hos norske hunder, noe som er et interessant utgangspunkt for videre studier av forekomsten av denne bakterien.

Forkortelser

<i>C. canimorsus</i>	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>
ONPG	Ortho-nitrophenyl- β -galaktopyranosid
IMM-UZH	Applied Microbiology Research group <i>Institute of Medical Microbiology University of Zurich</i>
HIA-SG	Heart infusion agar + 5% saueblod
Gm-HIA-SG	Heart infusion agar + 5% saueblod + 20 mg/L gentamicin
PCR	Polymerasekjedereaksjon
LPS	Lipopolisakkarider
DIC	Disseminert intravaskulær koagulasjon
Maldi-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight

Definisjoner

16S rRNA

16s ribosomal RNA

Septikemi

Bakterier i blodbanen

In vitro

I laboratorium, utenfor organismen

In vivo

I den levende organismen

Splenektomi

Kirurgisk fjerning av milten

Sjokk

Akutt sirkulasjonssvikt

Dysuri

Smertefull urinering

Pan-genom

Et sett gener innenfor en gruppe organismer som har utviklet seg fra samme stamfar

Innledning

Bakgrunnen for studien

Bakterien *C. canimorsus* er en normalflorabakterie i munnhulen hos hunder og katter (Suzuki et al., 2010). Navnet canimorsus er sammensatt av de latinske ordene canis, som betyr hund, og morsus som betyr å bite (Gaastra & Lipman, 2010). Den har ved flere anledninger vært årsak til alvorlig sykdom hos menneske (Brenner et al., 1989). Forekomsten er ikke undersøkt i Norge, og det finnes også sparsomt med epidemiologiske data fra andre land. Mange hunde- og katteeiere er ikke klar over risikoen et bitt fra dyret kan medføre med tanke på eksponering for forskjellige patogene bakterier. *C. canimorsus* er en av disse. Det finnes mange ulike serovarianter av denne bakterien, og de kan deles inn i høyvirulente og lavvirulente stammer (Umeda et al., 2014).

Applied Microbiology Research group ved *Institute of Medical Microbiology University of Zurich* (IMM-UZH) kontaktet NMBU Veterinærhøgskolen høsten 2022 med et ønske om å kartlegge forekomsten av *C. canimorsus* i flere land og danne en internasjonal stammebank. IMM-UZH besitter erfaring om prøvetaking og dyrkingsforhold av bakterien fra mennesker. De samarbeider blant annet med Francesco Renzi fra Namur Research Institute for Life Sciences i Belgia, som har erfaring med isolering av *C. canimorsus* fra dyr. Begge parter har bidratt til prosjektet med råd og veiledning, i tillegg til produksjon av agarskåler. Generelt har det blitt kartlagt at ca. 75% av hundepopulasjonen har denne bakterien i sin normalflora i munnhulen, hvorav ca. 5% av disse bærer en høyvirulent variant som kan forårsake alvorlig sykdom hos menneske (Suzuki et al., 2010). På grunn av praktiske hensyn ble prosjektet avgrenset til å undersøke forekomsten av *C. canimorsus* hos norske hunder på Østlandet. Hensiktene med dette prosjektet var å få en oversikt over forekomsten av *C. canimorsus* hos

norske hunder samt å bidra med isolater til den europeiske stammebanken og derved være nyttig for videre undersøkelser av *C. canimorsus*.

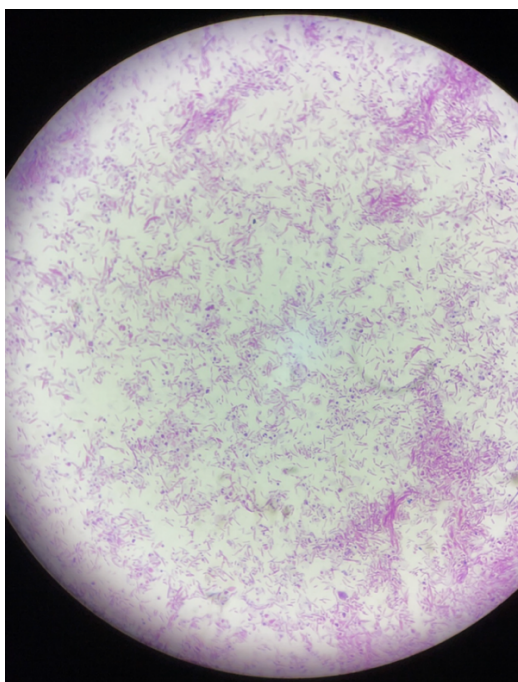
Generell risiko ved hundebitt

Ved hundebitt er risikoen for infeksjon stor ved at det avsettes bakterier fra hundens munnhule i sårlommen. Flere bakterier trives godt i slike sår hvor høy temperatur, god blodtilførsel og rikelig med materiale som bakteriene kan ernære seg av gir gode vekstforhold. Selv om såret rengjøres raskt etter bitt, kan det være utfordrende å fjerne alle bakteriene, spesielt om såret er dypt. Da kan bakteriene formere seg i såret, produsere virulensfaktorer som på ulike måter skader verten, og skape en betennelsesreaksjon i kroppen. Bakteriene kan videre bli tatt opp i blodet, noe som gir en septikemi. På denne måten kan infeksjonen spre seg til andre deler av kroppen.

Informasjon om bakterien

C. canimorsus er en Gram-negativ mellomlang stavbakterie som tilhører familien Flavobacteriaceae i rekken Bacteroidetes (Hess et al., 2017), se Figur 1. Tidligere ble bakterien kalt DF-2, der DF står for «dysgonic fermenter», og var en ikke-klassifisert bakterie. *C. canimorsus* er saktevoksende og vokser dårlig på kunstig medium (Brenner et al., 1989). Bakterien er mikroaerofil, som vil si at den vokser ved lave nivåer av oksygen og høye nivåer av karbondioksid. Disse egenskapene har gjort det utfordrende å lage en god protokoll for dyrking av bakterien. Det er vist at *C. canimorsus* vokser best på selektiv agar der vekst av mange av de øvrige normalflora-bakteriene hindres. I dette prosjektet er det brukt Heart infusion agar + 5% saueblod + 20 mg/L gentamicin som selektiv agar, der tilsetningen av gentamicin kraftig reduserer vekst av andre bakterier i prøven. Blod tilsettes for å dekke

bakterien sitt behov for jern (Gaastra & Lipman, 2010). Bakterien har glidende motilitet og biokjemisk er den positiv for oksidase- og katalase-aktivitet, skal kunne fermentere maltose og laktose og være positiv i en test for ONPG. Videre er den negativ for fermentering av raffinose og sukrose, samt negativ i indol-test og vekst på MacConkey agar (Brenner et al., 1989). Morfologisk viser bakterien seg først som meget små kolonier, som blir større ved lenger tids inkubering ved 37 °C. Koloniene har en konveks og glatt overflate, som er gråaktig med lillaskjær i fargen. Det finnes flere serovarianter av bakterien, der de mer virulente stammene er de som gir alvorlig sykdom hos menneske. Basert på forskjeller i 16S rRNA genet kan bakterien fordeles i gruppe I og gruppe II (Umeda et al., 2014). Dette er en rutinetest som baserer seg på en begrenset sekvensanalyse av genomet for rask identifikasjon av bakterier (Kleijnen-Grebien et al., 2008b). Nesten alle isolater av *C. canimorsus* fra humane pasienter tilhører gruppe I, noe som kan bety at denne gruppen kan smitte fra dyr til menneske og føre til sykdom. Det kan altså brukes polymerasekjedereaksjon for å skille mellom gruppe I og gruppe II, virulent og avirulent, basert på dette genet.



Figur 1: Gram-farget *C. canimorsus* sett ved 100 x oljeimmersjon

Smittevei

C. canimorsus er en normalflorabakterie i munnhulen hos friske hunder og katter, med størst forekomst hos hunder (Gaastra & Lipman, 2010). Bakterien er zoonotisk. Mennesker blir smittet gjennom nærkontakt med hunder og katter. Det er størst risiko for smitte ved bittskader, men andre smitteveier inkluderer sår fra kloring, slikking eller generell nærkontakt med dyret (Lion et al., 1996).

Patogenese

Når mennesker blir infisert med virulente stammer av *C. canimorsus* dannes det ingen potent immunrespons. Bakterien frigjør ikke pre-inflammatoriske cytokiner, chemokiner og nitrogenoksid som normalt skal tiltrekke seg immunceller til å bekjempe infeksjonen og på denne måten unngår den å aktivere det medfødte immunforsvaret. I tillegg har *C. canimorsus* lipopolisakkarider sin cellemembran som beskytter bakterien mot angrep og forhindrer fagocytose. Lipid A på LPS skal normalt interagere med humane toll-like reseptor 4 på immunceller, men det gjør ikke lipid A fra *C. canimorsus*. Det kan tyde på at Lipid A fra *C. canimorsus* er bygd opp annerledes enn hos andre patogener. Slike virulensegenskaper gir *C. canimorsus* mulighet til å unngå det humane immunsystemet og fremmer utviklingen av alvorlig sykdom (Shin et al., 2007).

C. canimorsus sin evne til immunsuppresjon hos verten er en av de viktigste patogenesemekanismene bakterien har. En annen viktig egenskap er hvordan bakterien ernærer seg av verten for å overleve og formere seg. Det er vist at *C. canimorsus* spiser overflateeksponerte glykoproteiner fra dyrkede pattedyrceller *in vitro*, og trolig er dette måten den livnærer seg *in vivo* (Mally et al., 2008). Bakterien bryter ned glykoproteinene i vertens cellemembran ved å skille ut neurominidase-enzymet sialidase, som kløyver av sialinsyre i

enden av glykoproteinet. På denne måten blir glykoproteinet tilgjengelig for konsumering (Mally et al., 2008).

Sykdom hos menneske

Virulente stammer av *C. canimorsus* kan føre til alvorlig sykdom hos mennesker og det er observert fatale tilfeller (Boyce & Price, 1980). Inkubasjonsperioden fra eksponering til sykdom er ca. fem dager (Gaastra & Lipman, 2010). Den vanligste formen for sykdom er septikemi. Andre sykdommer som kan oppstå er meningitt, endokarditt, artritt, pleuritt og øyeinfeksjoner. Individuer med immunsuppresjon har høyere risiko for å utvikle sykdom etter infeksjon og predisponerende faktorer inkluderer splenektomi og leverskader grunnet alkoholmisbruk. Symptomene varierer i alvorlighetsgrad, der de alvorligste formene gir fare for sjokk, respirasjonsproblemer og disseminert intravaskulær koagulasjon (Gaastra & Lipman, 2010).

Kasusstudier

Kasus 1

En kasusrapport fra 2008 viser hvordan *C. canimorsus* kan gi et fatalt utfall hos menneske etter et hundebitt som ved første øyekast kan virke ufarlig (Kleijnen-Grebien et al., 2008a). En 54- år gammel, tidligere frisk, mann ble innlagt på et sykehus i Nederland med symptomer forenelig med septikemi. To dager før innleggelsen hadde pasienten feber og dysuri og oppsøkte sin fastlege (Kleijnen-Grebien et al., 2008b). På grunn av mistanke om urinveisinfeksjon fikk pasienten utskrevet amoxicillin-klavulansyre for oralt bruk. Påfølgende natt våknet pasienten med kroppssmerter og en kald følelse og dro til legevakten. Fire dager

før innleggelse hadde pasienten blitt klørt på brystet og bitt i fingeren under lek med sin hund. Pasienten hadde ingen tidligere sykehistorie med immunsuppresjon eller alkoholmisbruk.

Ved innleggelse hadde pasienten dårlig perifer sirkulasjon med forlenget kapillærfyllningstid og blålilla misfarging av nese, lepper, ører og ekstremiteter. Han virket tydelig smertepåvirket. Blodutstryk viste intracellulære Gram-negative staver. Til tross for intensiv behandling med flere antibiotikum og intravenøs væsketilførsel døde pasienten halvannen dag etter innleggelse av septisk sjokk med multiorgansvikt og DIC. Det ble dyrket fra milten og etter en lang inkubasjonsperiode ble Gram-negative staver isolert. Disse ble identifisert som *C. canimorsus* basert på 16s-RNA-sekvensering.

Kasus 2

En kasusrapport fra 2019 beskriver en hendelse hvor en 46 år gammel mann ble innlagt på sykehus i Japan med feber, synsforstyrrelser og dyspne (Sakai et al., 2019). Pasienten hadde ingen forutgående sykehistorie, men hadde blitt bitt av en hund i sin venstre hånd tre måneder tidligere. Ekkokardiografi viste tilbakestrømming av blod gjennom aortaklaffen og vekst på klaffene og diagnosen sepsis med infeksiøs endokarditt ble stilt. Pasienten ble behandlet med antibiotikaene cefazolin og gentamycin etter mistanke om stafylokokk-infeksjon og gjennomgikk operasjon for hjerteklaff-transplantasjon. En uke etter operasjon ble det funnet Gram-negative bakterier etter dyrking fra pasientens blod. *C. canimorsus* ble bekreftet, gjennom 16s-rRNA-sekvensering av prøver fra både blodet og lesjonen på hjerteklaffen. Behandling med antibiotikumet ceftriaxone ble igangsatt da resistenstesting av bakterieisolatet viste at bakterien var sensitiv for beta-laktam antibiotika. Pasienten gjennomgikk antibiotikabehandling i fire uker og ble friskmeldt.

Kasus 3

En kasusrapport fra 2020 omhandler et tilfelle av purulent meningitt hos en 74 år gammel mann etter hundebitt fra en 4 måneder gammel valp (Prasil et al., 2020). Denne hendelsen fant sted i Tsjekia. Omtrent to uker etter bittet oppsto symptomer som hodepine og nakkestivhet, etterfulgt av feber. Pasienten sto til vanlig på medisiner mot diabetes type II, hypertensjon, høyt kolesterol og fettlever. Under de innledende undersøkelsene ble de konkludert at plagene kom fra meningene. Blodprøver viste høy CRP og leukocytose. Cerebrospinalvæsken inneholdt store mengder betennelsesceller, særlig nøytrofile granulocytter.

Etter et par dagers aerob og anaerob dyrking fra cerebrospinalvæsken var det ingen bakteriefunn. Det ble utført PCR som utelukket bakteriene *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus*, men det var tydelig at pan-genomet stammet fra bakterier. Senere ble DNA-sekvensering utført og *Capnocytophaga spp* identifisert. Etter syv dagers inkubering av utstryk fra cerebrospinalvæsken på agar ble det observert vekst av små kolonier. Mikroskopering av bakterier fra koloniene viste Gram-negative staver og ved bruk av Maldi-TOF ble *C. canimorsus* identifisert.

Før dyrkingssvar forelå ble diagnosen stilt som purulent meningitt uten kjent årsak og pasienten ble behandlet med kortison og intravenøs administrering av antibiotikumet ceftriaxone. Senere ble det igangsatt tilleggsbehandling med to andre former for antibiotika: ampicillin og vancomycin. Etter funn av *C. canimorsus* ble behandlingen redusert til intravenøs administrering av ceftriaxone. Pasienten responderte positivt og ble utskrevet fra sykehuset etter 15 dager.

Oppsummering av kasusrapporter

På bakgrunn av *C. canimorsus* sine saktevoksende egenskaper og krevende dyrkingsforhold blir rutinedyrkning av blodkulturer fra pasienter smittet av bakterien ofte negative. I tillegg er symptomene på infeksjon med *C. canimorsus* diffuse og uspesifikke. Dette gjør identifisering av *C. canimorsus* som årsak til sykdom utfordrende. Bakterien burde alltid være med på listen over differensialdiagnoser dersom dyreeiere utvikler feber med ukjent årsak (Sakai et al., 2019). Identifisering av bakterien er avhengig av en lengre inkuberingsperiode til tross for at blodkulturene initialt er negative. En slik inkubering etterfulgt av PCR og 16s-RNA-sekvensering, burde gjøres dersom sykdommens årsak er ukjent og anamnesen gir informasjon om kontakt med hunder eller katter.

Formål

Det overordnede målet med dette prosjektet var å kartlegge forekomsten av bakterien *C. canimorsus* hos norske hunder samt identifisere og karakterisere bakterieisolater fra munnprøver fra hunder. På denne måten ville prosjektet bidra til en internasjonal stammebank for denne bakterien (The global *Capnocytophaga* consortium) samt legge et grunnlag for videre studier av bakterien. Det spesifikke målet for prosjektet var å undersøke forekomsten av bakterien hos hunder på Østlandet, ved hjelp av spørreundersøkelse, prøvetaking og bakteriologisk laboratoriediagnostikk.

Materiale og metoder

Beskrivelse av studiepopulasjon

I dette prosjektet var studieenheten en hund, og studiepopulasjonen var norske hunder på Østlandet. Studieutvalget ble de hundene vi mottok svaberprøve fra etter å ha etterspurt prøver fra ansatte og studenter ved Veterinærhøgskolen, smådyrklikker, samt venner og bekjente.

Inklusjonskriterier

For å kunne være med i prosjektet ble det stilt krav om at det skulle være en hund, uavhengig av rase, kjønn og alder.

Eksklusjonskriterier

Det var ingen spesifikke kriterier som ekskluderte hundene fra studien. Allikevel ble det samlet inn informasjon gjennom et spørreskjema om forhold som kan ha betydning for forekomsten av *C. canimorsus*.

Variabler

Ved prøvetaking svarte eier på et spørreskjema med ulike variabler (se vedlegg 3).

Forklaringsvariablene var prøvetakningsdato, alder, hunderase, kjønn, reproduksjonsstatus, utenlandsreiser siste 6 måneder samt bruk av antibiotika siste 28 dager. I tillegg ble det spurt om hunden sto på faste medisiner og eventuelt hvilke. Opplysninger som ble vurdert mest relevante for prosjektet var eventuell antibiotikabruk innen de siste fire ukene og andre

medikamenter som eventuelt kan påvirke forekomsten av bakterien. Utfallsvariablene i studien var forekomst eller ikke forekomst av *C. canimorsus* i munnhulen hos hunden.

Rekruttering av hunder

For å kunne få informasjon om forekomsten av *C. canimorsus* hos norske hunder var det nødvendig å ta prøver fra en tilstrekkelig stor studiepopulasjon. En kompliserende faktor for innsamlingen var at *C. canimorsus* er en svært følsom bakterie som er avhengig av gode vilkår for å overleve. For lang tid mellom prøvetaking og utsæd på skål vil i stor grad redusere muligheten for å isolere bakterien. Løsningen ble derfor å få ferske prøver levert til NMBU Veterinærhøgskolen for direkte utsæd. En stor andel av både studenter og ansatte ved skolen eier en eller flere hunder og det ble bestemt at prøvetakingen i runde 1 skulle basere seg på disse hundene. For å komme i kontakt med personer med interesse for å bidra til prosjektet ble det sendt ut en e-post til alle veterinær- og dyrepleierstudenter ved skolen. I tillegg ble forespørselen publisert i det ukentlige nyhetsbrevet til de ansatte ved Veterinærhøgskolen. E-posten inneholdt en kort beskrivelse av prosjektet og *C. canimorsus*. Det viktigste for prosjektet i første omgang var å få samlet inn nok prøver. Interesserte mottakere ble oppfordret til å besvare e-posten for å få en oversikt over hvor mange prøver som kunne forventes. E-posten kan leses i sin helhet i vedlegg nr. 1.

For å få en større studiepopulasjon ble andre innsamlingsmetoder benyttet i tillegg. Ved hjelp av kontakter på EMPET Ryen Dyreklinikk og Evidensia Oslo Dyresykehus ble det samlet inn prøver fra oppstallede hunder eid av ansatte, i tillegg til pasienter som var på konsultasjon.

For å gjøre prøveinnsamlingen så lett som mulig for hundeeierne ble det satt opp en stasjon i Servicetorget i Hippocampus i Veterinærbygningen for henting og levering prøvetakings-kit.

Kitet inneholdt et informasjonsskriv, et spørreskjema og en kullsvaber av merket Oxoid, alt nummerert for å unngå eventuell blanding i ettertid da prøvene skulle være anonymisert. Informasjonsskrivet beskrev kortfattet prosjektet og gjorde rede for bakterien *C. canimorsus*. I tillegg inneholdt prøvetakings-kitet en detaljert beskrivelse av hvordan prøvetakingen av munnhulen skulle utføres. Dette var både av hensyn til at prøvetakingen skulle gjøres på en korrekt måte, men også for å få utføringen så lik som mulig til tross av at den ble gjennomført av mange ulike personer. Informasjonsskrivet og spørreskjemaet finnes henholdsvis i vedlegg nr. 2 og 3.

Revidering av prosjektmål- og omfang

Isolering og identifisering av *C. canimorsus* var helt nytt for alle involverte i prosjektet og det fantes ingen tidligere erfaring å bygge på. Av denne grunn ble det utført tre separate prøvetakings- og laboratorierunder. I runde 1 var studiepopulasjonen stor og det ble brukt mye tid på å samle inn et representativt utvalg av prøver for å kunne trekke slutninger om forekomsten av bakterien. Etter manglende påvisning ble flere feilkilder vurdert som mulig årsak. Fokuset til prosjektet skiftet fra å få en representativ studiepopulasjon til å påvise bakterien. Av denne grunn ble studieutvalget for runde 2 og 3 betydelig mindre og besto av hunder som eies av ansatte og studenter ved Veterinærhøgskolen. I runde 1 og 2 manglet den beste metodebeskrivelsen og riktig selektivt medium for dyrking av *C. canimorsus*. I runde 3 ble det benyttet riktig prøvetakingssvaber og Gm-HIA-SG, i tillegg til at alle prøvene ble sådd ut maksimum 1 time etter prøvetaking.

Prøvetaking

Selve prøvetakingen fra munnhulen til hunden ble utført av hver enkelt eier med en kullsvaber fra prøvetakings-kitet i runde 1 og 2. I runde 3 ble det brukt bomullssvaber i stedet for kullsvaber til prøvetakingen, etter protokoll tilsendt fra IMM-UZH. Prøven ble oppbevart i en plastpose før den ble sådd ut. En oral infeksjon eller inflammasjon vil kunne påvirke *C. canimorsus*, men en overordnet objektiv vurdering av forekomst av gingivitt, periodontitt eller leppefoldsdermatitt hos hundene var ikke mulig pga. ulik medisinsk kompetanse hos de som utførte prøvetakingen. Svaberen skulle tas så nær dyrkingsdag som mulig og optimalt samme morgen som prøvene skulle dyrkes. Samtlige prøver hentet fra dyreklinikker ble oppbevart i kjøleskap eller i kjølebag og sådd ut på Heart infusion agar + 5% saueblod samme dag. Prøver som ble samlet inn fra bekjente utenfor skolen ble sådd ut påfølgende dag, men oppbevart kjølig i mellomtiden. Opplysningene på spørreskjemaene ble umiddelbart notert inn i et datasett i Excel og sortert på bakgrunn av de tilhørende prøvenumrene, se vedlegg nr. 4 og 5. Etter hvert som prøvene ble analysert ble resultatene notert i et eget datasett.

Beskrivelse av forberedende prosedyrer

Utsåing av svaberprøver og inkubering

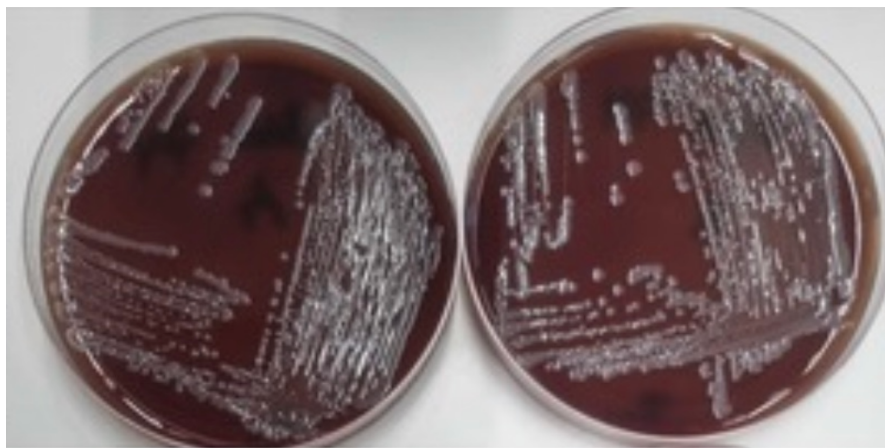
HIA-SG og Gm-HIA-SG ble produsert av IMM-UZH og sendt i posten til NMBU. Svaberprøvene ble ved runde 1 og 2 sådd ut på HIA-SG batch Capno_001, produsert 11.08.2022, EXP 11.02.2023 og Capno_002, produsert 07.10.2022, EXP: 07.05.2023. I runde 3 ble det benyttet Gm- HIA-SG, batch: Capno_002, produsert 23.01.2023, EXP 23.04.2023. Utsæd foregikk direkte fra svaber og prøven ble fortynnet to ganger med plast-podeøse. Prøvenummer og dato for utsæd ble notert på skålene. Prøvene ble inkubert ved 37° C i 48 timer sammen med anaeropack – microaerophilic (Thermo Scientific) i lufttette kolber for å

oppnå et mikroaerofilt miljø. Oksygenivået ble da senket til 6-12% og karbondioksidnivået økt til 5-8%.

Plukking av kolonier

Etter inkubering på HIA-SG i runde 1 og 2 ble det observert mange forskjellige kolonier med ulikt utseende på agarskålene. I runde 3 var koloniene mer ensartede i utseende etter utsåing på Gm-HIA-SG. For å dyrke renkultur ble det plukket 2-4 enkeltkolonier for videre arbeid.

Ved runde 1 ble det valgt store, hvite, ikke-hemolytiske kolonier med lipid-lignende konsistens basert på bilde av positiv kontroll tilsendt fra IMM-UZH, se Figur 2. Ved runde 2 og 3 ble det brukt en reell positiv kontroll og kolonier fra utstryk av prøvemateriale ble sammenlignet med denne. Koloniene til positiv kontroll var konfluerende, fete, slimaktige, grålige med lillaskjær farge og ikke-hemolytiske, se Figur 3. Renkultur ble sådd ut uten fortykning på HIA-SG ved runde 1 og 2, og på Gm-HIA-SG ved runde 3. Disse skålene ble merket med dato for utsæd, prøvenummer og enkeltkoloninumner 1-4, og deretter inkubert i mikroaerofilt miljø ved 37° C i 24 timer.



Figur 2: Bilde fra IMM-UZH av positiv kontroll *C. canimorsus*



Figur 3: Positiv kontroll

Beskrivelse av biokjemiske tester

For å verifisere *C. canimorsus* ble det utført flere biokjemiske tester på alle renkulturene. Bakterien skal være positiv for både katalase og oksidase aktivitet, så disse testene ble utført først for å raskt kunne utelukke feil bakteriekolonier. Renkulturer som var positive for katalase og oksidase ble testet videre med ONPG, indol, laktose, maltose, raffinose, sukrose og Gram-farging. Det ble også testet for aerob vekst på renkulturene som en ekstra kontroll. Underveis ble alle resultater registrert inn i datasett på Excel, se vedlegg nr. 6 og 7. For visuell oversikt over rekkefølge av biokjemiske tester under de ulike rundene, se vedlegg nr. 8, 9 og 10.

Katalase

Denne metoden har som formål å undersøke om bakterien produserer enzymet katalase som spalter hydrogenperoksid til vann og oksygen. Hydrogenperoksid er et endeprodukt som dannes i den aerobe metabolismen hos bakteriene. Metoden ble utført ved å avsette en bakteriekoloni på et objektglass og deretter dryppe en dråpe med hydrogenperoksid over.

Testen er positiv om det bruser når man tilsetter hydrogenperoksid og negativ dersom det ikke er noen reaksjon. Brusingen skyldes dannelsen av oksygen i spaltingen (Wold & L'Abée-Lund, 2012). *C. canimorsus* er positiv på katalase.

Oksidase

Denne biokjemiske testen skal undersøke om bakterien produserer respirasjonsenzymet cytokrom c oksidase. Det ble brukt oksidase-strips fra Sigma-Aldrich og Millipore.

Bakteriemateriale ble påført stripsen og avlest etter 60 sekunder. Positivt svar vil vise seg som en blå farge, mens en negativ test ikke vil ha noen fargeforandring (Wold & L'Abée-Lund, 2012). Utslagene på testen ble kategorisert som «positiv», «svak positiv» og «negativ» etter styrken på fargeomslaget. *C. canimorsus* skal være positiv på denne testen, og både positive og svakt positive ble inkludert for videre biokjemiske tester.

ONPG

Denne testen viser om bakterien produserer enzymet beta-galaktosidas. Dette enzymet katalyserer hydrolyse av galaktose β -1-4 glukosebindingen i laktose og gir deretter utslag på testen i form av fargeforandring. Det ble benyttet ONPG-plater 100 μ g fra merket BD BBL. Det ble overført 1 mL sterilt saltvann til et brønnbrett og rikelig bakteriemateriale ble inokulert ved hjelp av en plastpodeøse. I forkant av inokuleringen må renkulturen bli sådd ut på et laktosemedium for å indusere produksjon av beta-galaktosidase. Dette ble ikke gjort i runde 1 og 2. Brønnbrettet ble markert med prøvenummer og inokuleringsdato. Til slutt ble ONPG-platene plassert forsiktig i brønnene ved hjelp av en ren pinsett og brettet ble inkubert mikroaerofilt ved 37° C. Prøvene ble avlest etter 4, 24 og 48 timer. Testen skal i

utgangspunktet avleses etter 4 timer, men grunnet manglende fargeomslag ble prøvene vurdert over et lengre tidsintervall, da *C. canimorsus* er saktevoksende. Ved runde 3 viste det seg at bakterien vokste dårlig på blåskål som ble brukt som laktosemedium, og ONPG-testen ble derfor ikke mulig å gjennomføre. *C. canimorsus* skal være positiv for denne testen og dermed gi fargeforandring fra hvit til gul ONPG-disc (Becton, 2015).

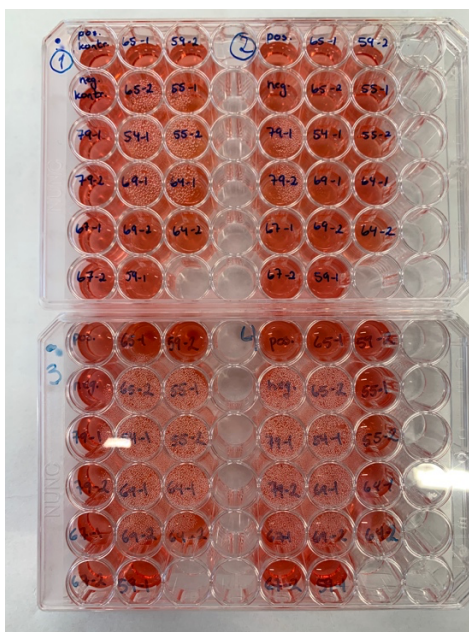
Indol

Testen viser om bakterien produserer et enzym som kan spalte aminosyren tryptofan. I denne prosessen blir det dannet indol og det påvises ved å tilsette et reagens som inneholder p-dimetylamino-benzaldehyd. Reagenset binder seg til indol og gir en rød ring øverst i mediet. (Wold & L'Abée-Lund, 2012) Bakteriemateriale ble inokulert ved hjelp av plastpodeøser i reagensrør som inneholdt tryptofan i en pepton-buljong. Reagensrørene ble markert med prøvenummer og inokuleringsdato før de ble inkubert mikroaerofilt ved 37 °C i 48 timer. Etter 48 timer ble det tilsatt 100 µL av Kovacs reagens. Reagenset ble tilsatt forsiktig ved å la det renne nedover kanten i reagensrøret. *C. canimorsus* skal være negativ for denne testen, noe som vil si at det dannes en gul ring på toppen av mediet.

Karbohydratspalting

Denne metoden viser om en bakterie har egenskapen til å spalte ulike karbohydratkilder og dermed gi utslag i form av produksjon av syre og/eller gass. Karbohydratmediet som brukes er tilsatt en pH-indikator som vil gi en fargeforandring ved syreproduksjon (Wold & L'Abée-Lund, 2012). Her ble det brukt fenolrødt som fører til at mediet endrer farge til gul ved produksjon av syre. Flere forskjellige karbohydratmedier kan benyttes, men i dette prosjektet ble maltose, laktose, sukrose og raffinose valgt. Det ble brukt flytende karbohydratmedier og

kun undersøkt for syreproduksjon. En ml av hvert karbohydratmedium ble overført til et brønnbrett og mediene ble deretter inokulert med bakteriemateriale ved hjelp av plastpodeøser. Brønnbrettet ble markert med prøvenummer og inokuleringsdato, se Figur 4. Prøven ble inkubert mikroaerofilt ved 37 °C og avlest etter 24 og 48 timer, grunnet saktevoksende bakterier. *C. canimorsus* har positivt utslag på maltose og laktose som vises ved fargeforandring fra rød til gul. Bakterien er negativ for sukrose og raffinose som ikke gir fargeforandring.



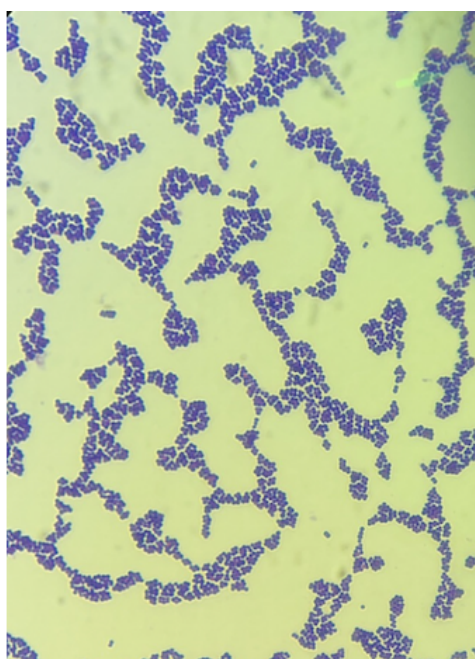
Figur 4: Brønnbrett for testing av karbohydratspalting

Aerob vekst

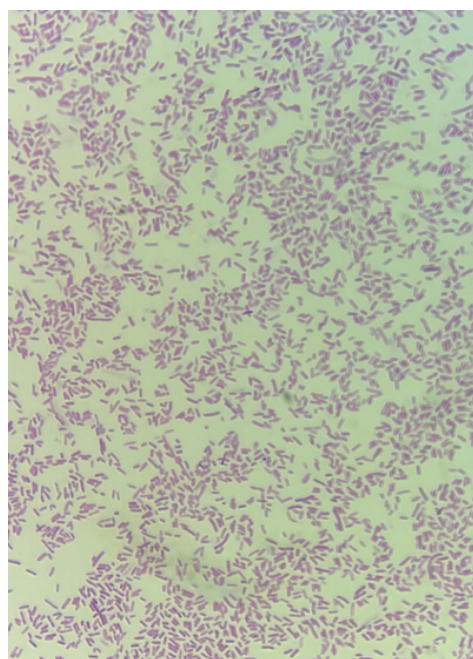
Dette er en test som viser om en bakterie kan vokse i normale konsentrasjoner av oksygen. I vanlig luft er det ca. 21% oksygen. Renkulturene ble sådd ut på blodagar-skål og inkubert aerobt ved 37° C i 24 timer. *C. canimorsus* er en mikroaerofil bakterie og vil derfor ikke vokse aerobt.

Gram-farging

Gram-farging er en metode som gir ulikt utslag avhengig av hvordan celleveggen til bakteriene er bygd opp. Gram-positive bakterier har mye peptidoglykaner i celleveggen som tar opp fargestoffet metylfiolett slik at det ikke vaskes bort av alkohol. Dette gir en mørk lilla farge. Gram-negative bakterier har en mer kompleks oppbygd cellevegg med et høyere innhold av lipider i forhold til peptidoglykaner. Av denne grunn vaskes lillafargen bort av alkohol. Etter farging med karbolfuksin vil Gram-negative bakterier ha en rosa farge. (Wold & L'Abée-Lund, 2012). Metoden ble utført ved å ta en liten mengde bakteriemateriale på et objektglass i en dråpe vann før det ble fiksert med varme. Videre ble det tilsatt fargestoffet metylfiolett og jodløsningen Lugol. Til slutt ble løsningene vasket bort med 96% Mic-sprit før karbolfuksin ble tilsatt. Etter skylling med vann ble prøven undersøkt i mikroskop med oljeimmersjon under 100x objektet. *C. canimorsus* er en mellomlang Gram-negativ, stavbakterie. Den vil derfor ses som lys rosa i mikroskopet. Gram-positiv kontroll var *Staphylococcus aureus* og Gram-negativ kontroll var *Escherichia coli*, se Figur 5 og Figur 6.



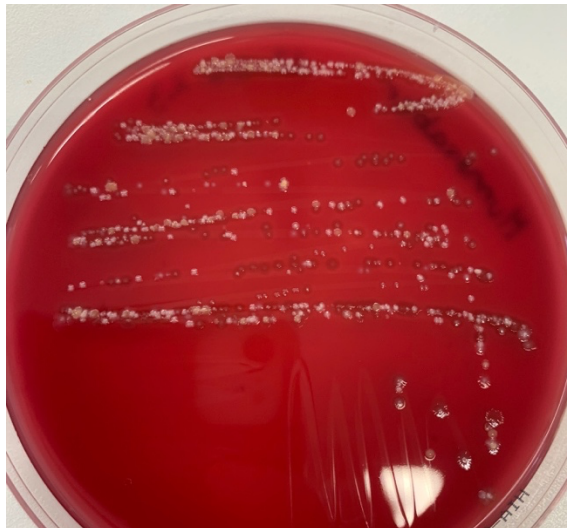
Figur 5: Gram-positive kokker – *S. aureus*.



Figur 6: Gram-negative staver – *E.coli*

Resultater

I runde 1 ble det totalt samlet inn svaber fra 66 hunder som ble sådd ut på HIA-SG. På samtlige skåler vokste det blandingsflora, se Figur 7. Det var dermed ikke mulig å starte identifisering av *C. canimorsus* med Gram-farging og biokjemiske tester fra disse koloniene. Det ble derfor plukket renkulturer til HIA-SG for videre arbeid. Ved morfologisk undersøkelse av renkulturene var det stor variasjon i både størrelse, utseende og konsistens. Resultatene for de biokjemiske testene varierte mellom de forskjellige renkulturene og ingen av koloniene hadde samsvar med *C. canimorsus* sine biokjemiske egenskaper. Av denne grunn ble renkulturene inkubert i aerobt miljø for å kunne utelukke eksemplarene som vokser med 21% oksygen. Alle renkulturene vokste aerobt som avkreftet at de inneholdt *C. canimorsus*.



Figur 7: Blandingsflora på HIA-SG etter inkubering i 24 timer

I runde 2 ble det samlet inn svaber fra 10 hunder. I likhet med runde 1 var det vekst av blandingsflora på HIA-SG. Samtidig med utsåing av kolonier til renkultur ble de samme enkeltkoloniene sådd ut på HIA-SG for aerob inkubering. Etter 24 timer var det aerob vekst

på samtlige renkulturer, men med variasjon i graden av vekst. For å kunne gå videre med biokjemiske tester på noen prøver ble renkulturer med sparsom vekst under aerobe forhold tatt med videre. Det var også i denne runden stor variasjon i morfologi og resultater på Gramfarging og biokjemiske tester. På bakgrunn av disse avvikende resultatene ble funn av *C. canimorsus* avkreftet.

I runde 3 ble det i likhet med runde 2 samlet inn svaber fra 10 hunder, se oversikt i Tabell 1.

Etter 24 timers inkubering var det vekst på alle Gm-HIA-SG, unntatt én (nummer 78).

Veksten var av varierende grad, så for å muliggjøre plukking av enkeltkolonier ble skålene inkubert i 24 timer til. På skålene vokste det fremdeles en blandingsflora, men i svært mindre grad enn i runde 1 og 2, se Figur 8. På alle ni skålene med vekst var det enkeltkolonier med tilsvarende morfologi som positiv kontroll, se Figur 9. Etter 24 timers inkubering av renkulturer ble det observert vekst fra åtte av svaberprøvene. Renkulturer fra prøve nummer 60 hadde ingen vekst og disse ble derfor ekskludert fra biokjemiske undersøkelser.

Morfologisk utseende for majoriteten av renkulturene var like og tilsvarende positiv kontroll, se Tabell 2.

Prøvenr.	Rase	Kjønn	Alder	Faste med.?	Virkestoff	Antibiotika siste 28 dager?	Utenlandsreise siste 6mnd?	Hvor?	Kull på tisper?	Født i Norge?	Påvist?
60	Hvit gjeterhund	♂	3,5	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
79	Australsk gjeterhund	♂	1	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
69	Norsk Lundehund	♂	2	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
78	Cocker spaniel	♀	3,5	Ja	Meloksikam, Gabapentin	Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei
59	Jaktgolden retriever	♂	1	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
67	Borzoi	♀	3	Nei		Nei	Nei			Nei	Nei
64	Engelsk setter	♂	9	Ja	Bedinvetmab (inj.)	Nei	Nei			Ja	Nei
54	Stor puddel	♂	1	Nei		Nei	Ja	Sverige		Ja	Nei
65	Engelsk setter	♀	2,5	Ja	Desloratadin (tabl.)	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
55	Dansk-svensk gårdshund		1,5	Nei		Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei

Tabell 1: Denne tabellen viser oversikten de ulike forklaringsvariablene som er etterspurt i spørreundersøkelsen ved innsamling av svaberprøver. Lengst til høyre er svar på utfallsvariabelen om *C. canimorsus* er påvist eller ikke. Prøvetakingsdato og utsåingsdato er 20.02.2023 for disse prøvene.

Prøvenr.	Makroskopisk morfologi	Gramfarging
79,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, noe kortere, tynne, staver.
79,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, veldig tynne staver.
67,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
67,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
65,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
65,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
54,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
69,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
69,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
59,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, noe kortere, tynne, staver.
59,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
55,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
55,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
64,1	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
64,2	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, noe kortere, tynne, staver.
64,3	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige, flate kolonier.	
Pos.	Konfluerende, slimaktige kolonier. Gråaktige med lillaskjær, flate kolonier.	Gram negative, mellomlange, tynne staver.
kontr.		

Tabell 2: Beskrivelse av makroskopisk og mikroskopisk morfologi for renkulturene



Figur 8: Blandingsflora på Gm-HIA-SG etter inkubering i 48 timer

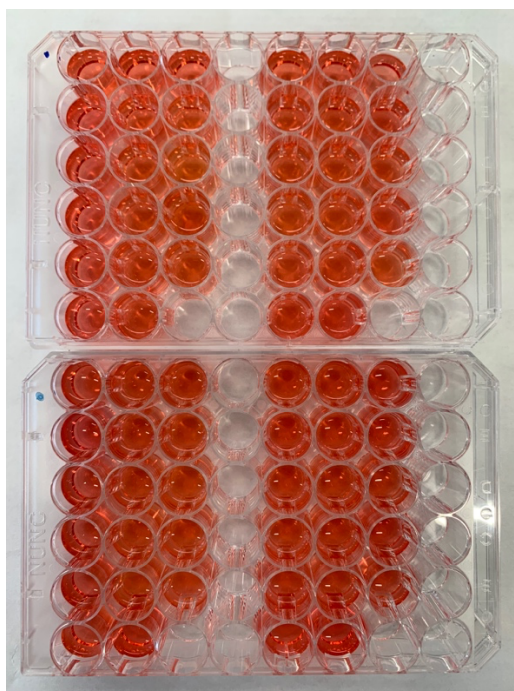


Figur 9: Kolonier med lignende morfologi som positiv kontroll

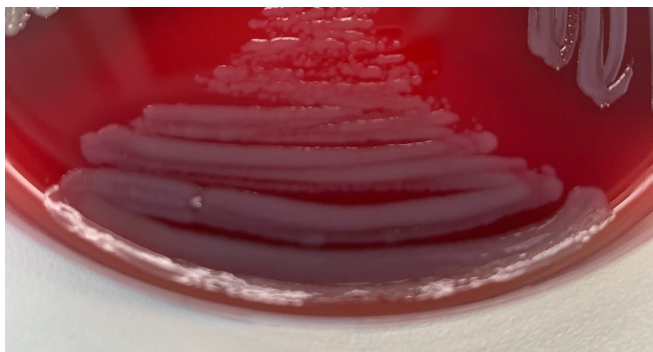
Ved testing av katalase og oksidase ble ytterligere én renkultur ekskludert, grunnet negativt resultat på katalase. Gjenværende 15 renkulturer ble Gram-farget og undersøkt for evne til aerob vekst, karbohydratspalting og indol. ONPG-test på positiv kontroll ble i forkant testet og resultatet ble feilaktig negativt. På bakgrunn av dette ble denne testen derfor ekskludert fra protokollen for testing av *C. canimorsus*. Samtlige renkulturer viste seg som Gram-negative staver ved Gram-farging. Etter 24 timers inkubering var de fire karbohydrattestene negative for alle renkulturer, inkludert positiv kontroll, se Figur 10. For å ta høyde for *C. canimorsus* sin langsomme vekst ble prøvene i tillegg undersøkt etter 72 timer. Da var samtlige fremdeles negative. Det var aerob vekst på samtlige renkulturer, også inkludert positiv kontroll, se Figur 11. Se tabell 3 for oversikt over resultatene for de biokjemiske testene. Etter 24 timers dyrking var det lite vekst i reagensrørene for indol-test. Disse ble av denne grunn inkubert i 72 timer før Kovacs reagens ble tilsatt. Alle prøver hadde negativt resultat, inkludert positiv kontroll, men det var lite bakterievekst i rørene. På bakgrunn av testresultatene er det avkreftet at verken den versjonen av positiv kontroll som ble brukt eller prøvene var *C. canimorsus*.

Prøvenr.	Vekst på agarskål:	Aerob vekst:	Oksidase	Katalase	Maltose	Laktose	Sukrose	Raffinose	Indol	Maldi-TOF	Påvist?
79,1	Ja	Lite	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
79,2	Ja	Minimalt	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
67,1	Ja	Lite	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
67,2	Ja	Lite	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
65,1	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
65,2	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
54,1	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
69,1	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
69,2	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
59,1	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
59,2	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
55,1	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
55,2	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
64,1	Ja	Ja	Pos	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
64,2	Ja	Ja	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
64,3	Ja	Ja	Pos	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		Nei
Pos.	Ja	Ja	Pos. (svak)	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Nei
Kontr.											

Tabell 3: Resultater på biokjemiske tester av renkulturene



Figur 10: Negative prøveresultater for maltose, laktose, sukrose og raffinose etter inkubering i 24 timer



Figur 11: Aerob vekst på positiv kontroll

Diskusjon

Feilkilder

Dette prosjektet består av flere deler, fra spørreskjema og prøveinnsamling til utsåing og biokjemiske tester. Det er mange steg hvor utførelsen må være korrekt, noe som innebærer muligheter for feil. Mulige feilkilder vil bli gjennomgått her.

Utførelse av prøvetaking

I forbindelse med prøveinnsamlingen er det atskillige ting som kan ha gått galt. En faktor kan være at *C. canimorsus* ikke overlever i valgte svaber. I runde 1 og 2 ble det benyttet kullsvaber. Dersom bakterien ikke overlever i kullsvaberen vil en slik oppbevaring resultere i falske negative prøvesvar. I runde 3 ble det brukt bomullsvabere til prøvetakingen etter protokoll fra IMM-UZH. Det var eier som tok svaberprøven fra munnhulen av sin hund og ikke erfarent personell, noe som kan medføre at utførelsen ikke har vært optimal. I verste fall har ikke prøven blitt godt nok fuktet med spytt slik at *C. canimorsus* ikke ble med i svaberen. En annen utfordring kan være kontaminering av svaberen slik at det oppstår konkurranse om overlevelse for eventuelle *C. canimorsus* i prøven. Mange ulike prøvetakere innebærer også

en risiko for at prøvetakingen er utført på forskjellige måter, noe som gjør resultatene vanskelige å sammenligne. Videre kan prøvene ha blitt oppbevart feil etter prøvetakingstidspunkt. På denne måten kan eventuelle *C. canimorsus* som har blitt med i prøven dø som følge av manglende nedkjøling og dermed gi et falskt negativt resultat. Beskrevne feilkilder har blitt forsøkt motvirket ved hjelp av informasjonsskrivet i prøvetakings-kitet for å kompensere for at det ikke er samme person som utfører all prøvetakingen.

Tidspunkt for prøvetaking

En vesentlig feilkilde er tidspunktet for prøvetakingen. *C. canimorsus* krever gode vekstforhold og det er uvisst om bakterien overlever i kullsvaberen over lengre tid. Dette gjorde prøveinnsamlingen betydelig mer komplisert da prøver måtte tas og dyrkes fra samme dag. Av denne grunn var det ikke mulig å samle inn prøver over en lengre periode eller over større avstander før utsåingen ble gjennomført. Dette resulterte også i at laboratoriearbeidet måtte gjennomføres i et planlagt og svært konsentrert tidsrom, noe som ga liten mulighet for at hundeeiere kunne levere inn prøver over flere dager. I tillegg måtte flere prøver ekskluderes fra prosjektet da de av ulike årsaker ikke ble levert til avtalt tid. Som tidligere beskrevet var det nødvendig å ta i bruk flere innsamlingsmetoder for å få en stor nok studiepopulasjon i runde 1. Dette medførte en stor variasjon i hvor lenge prøvene ble oppbevart før utsåing, alt fra 15 minutter til 24 timer. I runde 2 og 3 var studiepopulasjonen mindre og prøvene ble sådd ut innen en halvtime for å øke sannsynligheten for overlevelse av *C. canimorsus*.

Utfylling av spørreskjema

Ved gjennomgang av de utfylte spørreskjemaene ble det tydelig at utformingen hadde mye å si for hva som ble besvart og ikke. Et gjentakende problem viste seg å være manglende utfylling av kjønn og reproduksjonsstatus. Denne delen hadde et annet format enn de øvrige spørsmålene, hvor hundeeier skulle sette en ring rundt det alternativet som passet for deres hund. Dersom spørreskjemaet ble utfylt uten nøye gjennomlesing kan denne delen mistolkes som informasjon og dermed overses. Et annet punkt som ofte manglet var informasjon om fødselsdato. Her er utformingen lik de andre spørsmålene og det er mer sannsynlig at mangelen skyldes at eier ikke vet fødselsdatoen. En annen årsak kan være at eier ikke husker fødselsdatoen og har tenkt til å undersøke dette, men så har glemt det. Ulike hundeeiere har ulik kjennskap til medisiner og virkestoffer, og dette medførte feilaktig utfylling av medisiner i spørreskjemaet. Et eksempel er forveksling av NSAIDs og antibiotika. Dette skaper forvirring og usikkerhet ved avlesning om eier har sammenblandet disse medisingrupperne eller om hunden står på begge. En siste bemerkning avgående spørreskjemaene er oppdagelsen av manglende spørsmål i ettertid. En opplysning som kunne vært relevant å ha er hundens fødselsland, da det er mulig at forekomsten av *C. canimorsus* varierer mellom land og eksponering fra fødsel kan være en faktor for forekomsten hos eldre hunder. I tillegg skapte anonymiseringen av prøver og spørreskjema problemer med tilbakemelding, da det var mange eiere som var nysgjerrige på prøvesvaret for sin hund.

Laboratoriearbeid

Feilkilder knyttet til arbeidet på laboratoriet kan også være en årsak til falske negative resultater. Det er mulig at *C. canimorsus* ikke overlever frem til plukkingen av renkultur. Dette enten fordi bakterien ikke har overlevd i kullsvaber eller fordi den ikke overlever på HIA-SG pga konkurranseforhold i blandingsflora. Sistnevnte ble vurdert som lite sannsynlig,

da agar var spesiallaget for denne bakterien og tilsendt fra IMM-UZH. På grunn av en misforståelse hos IMM-UZH som ikke ble oppklart før etter prøverunde 1 og 2 viste det seg imidlertid at det vi hadde oppfattet som Gm-HIA-SG kun var HIA-SG som ikke var tilsatt gentamicin. Dette er forklaringen på rikelige veksten av blandingsflora som ble observert fra prøverunde 1 og 2. I runde 3 ble det brukt Gm-HIA-SG som inneholdt gentamicin som begrenser veksten av andre bakterier enn *C. canimorsus*. Her var det også noe vekst av blandingsflora, men i mye lavere grad, så konkurranseforholdene i blandingsflora regnes som lite sannsynlig.

På grunn av vekst av blandingsflora måtte enkeltkolonier plukkes over til renkultur og inkuberes på nytt. Mangel på positiv kontroll i runde 1 gjorde det utfordrende å vite hvilke kolonier som skulle plukkes, og denne avgjørelsen ble basert på et noe uklart bilde av positiv kontroll tilsendt fra IMM-UZH. Dersom feil kolonier ble vurdert til å samsvare med bilde av positiv kontroll vil dette kunne gi feil prøvesvar på videre biokjemiske undersøkelser. I runde 2 ble sammenligningen utført mot en positiv kontroll tilsendt fra IMM-UZH som ble dyrket parallelt med prøvene. Det er allikevel svært sannsynlig at feil kolonier ble plukket over til renkultur da svært få kolonier hadde klare likheter med den positive kontrollen.

Da det var mindre blandingsflora i runde 3 var det færre kolonier å velge mellom ved plukking til renkultur, men det kan allikevel ikke utelukkes at feil kolonier har blitt valgt. Det ble mistenkt at positiv kontroll som ble brukt til sammenligning ikke var *C. canimorsus* pga misvisende resultater på de biokjemiske testene for kontrollen. Dette ble bekreftet ved hjelp av Maldi-TOF. Dermed er det mulig at feil kolonier ble plukket til renkultur siden disse ble plukket på bakgrunn av morfologisk likhet med en positiv kontroll som ikke var *C. canimorsus*. Isolatet av denne bakterien som ble tilsendt fra IMM-UZH ble også testet ved

hjelp av Maldi-TOF og det ble bekreftet at dette var *C. canimorsus*. Det er uvisst på hvilket tidspunkt den positive kontrollen som ble brukt i runde 3 ble forurenset.

Andre mulige feilkilder knyttet til laboratoriearbeidet er feil gjennomføring av de biokjemiske testene. En mulig årsak er at det har blitt inokulert for lite bakterier i testmediene. Det er også usikkert om *C. canimorsus* klarer å vokse i de ulike mediene som ble brukt. Mangel på både positiv og negativ kontroll i runde 1 medførte at det ikke var mulig å utelukke om det var noe galt med reagensene som ble benyttet. Manglende negativ kontroll skyldtes lite laborerfaring. Da testen for ONPG ble satt opp i runde 1 og 2 hadde ikke koloniene i forkant vokst på laktosemedium. Dette kan forklare hvorfor positiv kontroll var feilaktig negativ på denne testen. Dette forklarer likevel ikke det negative resultatet på positiv kontroll satt i runde 3. Da var positiv kontroll sådd ut på laktoseskål før kolonier herfra ble plukket til ONPG-testing. Det var imidlertid sparsom vekst av positiv kontroll på blåskålen som gjorde inokulering av nok bakteriemateriale utfordrende. Det er også en mulighet at den positive kontrollen hadde blitt forurenset på dette tidspunktet og det negative resultatet skyldtes inokulering av en annen bakterie enn *C. canimorsus*.

Resultater

Årsaken til at *C. canimorsus* ikke har blitt påvist på laboratoriet er usikker. Det er overordnet to muligheter for dette resultatet. På den ene siden kan det skyldes at forekomsten av *C. canimorsus* er lav hos norske hunder og de negative resultatene dermed er reelle og gjenspeiler fraværet av bakterien i den norske hundepopulasjonen. På den andre siden kan det være at det ikke har vært mulig å påvise bakterien med metodene som ble brukt i dette prosjektet, selv om *C. canimorsus* forekommer hos norske hunder.

Konklusjon

Gjennom prosjektet har det ikke blitt funnet *C. canimorsus* fra noen av de totalt 86 prøvene.

Dette gir en forekomst på 0 %, noe som ikke blir sett på som reelt ut ifra den tidligere rapporterte forekomsten på ca. 75 % (Suzuki et al., 2010). I denne sammenheng anses overlevelse i svaber og plukking av kolonier til renkultur som de største feilkildene.

De to mest sannsynlige årsakene til at det ikke har vært mulig å isolere *C. canimorsus* anses å være overlevelse i svaber og plukking av kolonier til renkultur. Det er en stor mulighet for at bakterien ikke har overlevd fra munnhulen til utsæd. Enten pga. for lang tid fra prøvetaking til utsåing eller lite gunstig oppbevaringsmedium for svaberen. Når det gjelder plukking av kolonier kan det ha blitt gjort feil vurdering av hvilke kolonier som skal undersøkes videre, selv om bakterien var til stede på agaren etter utsåing fra svaber. Ved feilplukking vil resterende kolonier bli ekskludert fra videre omfattende biokjemiske undersøkelser og bakterien kan forbli uidentifisert.

Som tidligere beskrevet er det mange mulige feilkilder i dette prosjektet som med overveiende sannsynlighet har påvirket til det negative resultatet. Allikevel kan det ikke konkluderes med 100% sikkerhet at resultatet er feil. Etersom forekomsten av *C. canimorus* aldri tidligere har blitt undersøkt i Norge, kan det ikke avkreftes at forekomsten er svært lav. Kanskje *C. canimorsus* ikke er en normalflorabakterie hos norske hunder? Av denne grunn bør det utføres videre undersøkelser om forekomsten av denne bakterien i Norge. Da kan det med større sikkerhet trekkes konklusjoner rundt dette resultatet.

Takk til bidragsytere

Vi ønsker å takke våre veiledere Yngvild Wasteson og Marina Aspholm for støtte, oppmuntring og hjelp underveis i prosjektet. Deres kunnskap, og ikke minst positivitet og gode humør, har gitt en stor trygghet underveis i arbeidet. En meget stor takk rettes også til Kristin O'Sullivan for gode råd, tålmodighet og strålende veiledning i forbindelse med laboratoriearbeidet. I denne sammenheng ønsker vi også å takke Amanda Morken Andersen for god hjelp ved utførelse av biokjemiske tester. Resten av teamet ved faggruppen Mattrygghet takkes for å vise et stort engasjement rundt oppgavens tema. En takk rettes også til IMM-UZH og deres samarbeidspartnere for produksjon av agarskåler, samt råd og veiledning om prøvetaking og dyrkingsforhold av *C. canimorsus*. Til slutt ønsker vi å takke alle som har bidratt for at vi skal få samlet inn mest mulig prøvemateriale.

Summary

Title: Isolation of *Capnocytophaga canimorsus* from Norwegian dogs

Authors: Johanne Fjellså and Kaja F. Ilbråten

Supervisor: Marina Aspholm and Yngvild Wasteson, NMBU Veterinærhøgskolen,
Department of Paraclinical Sciences, Food Safety Unit

The purpose of this study was to map the occurrence of *Capnocytophaga canimorsus* in Norwegian dogs situated in the Southeastern part of Norway. *C. canimorsus* is a rod-shaped bacterium normally occurring in the oral cavity of dogs and cats. For humans, however, exposure to virulent strains of this bacterium may cause serious illness. In total, 86 swabs were collected from the oral cavity of dogs that met the identified criteria for the study, and a questionnaire was filled out by their respective owners. During the laboratory work, challenges related to the growth and identification of *C. canimorsus*, which resulted in the purpose of the study changing from mapping the occurrence of these bacteria to optimizing the protocol for isolation and identification. The methods used in this protocol included microaerophilic incubation on selective agar, followed by Gram-staining and further biochemical tests to verify the bacteria. *C. canimorsus* should test positive for oxidase, catalase, maltose, lactose and ortho-nitrophenyl- β -galactoside, and negative for raffinose, sucrose and indole. After three separate rounds of testing, no *C. canimorsus* were identified from the samples. The negative result was, however, probably associated with mistakes during the sampling and laboratory work, rather than a 0% occurrence of the bacteria in the sampled dog population. Thus, the probable sources of the negative results may be related to storage of the testing material and the selection of colonies for pure cultures. Having said that, one cannot exclude that there is causation between the low occurrence of *C. canimorsus* in Norwegian dogs and the aforementioned negative result.

Referanser

- Becton, D. a. C. (2015). *BD BBL Taxo ONPG Discs*. bd.com.
- Boyce, F. & Price, R. F. (1980). Splenectomized patient with fatal DF-2 septicemia. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2 (8): 4. doi: [https://doi.org/10.1016/S0196-4399\(80\)80200-5](https://doi.org/10.1016/S0196-4399(80)80200-5).
- Brenner, D. J., Hollis, D. G., Fanning, G. R. & Weaver, R. E. (1989). *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (2): 231-235. doi: doi:10.1128/jcm.27.2.231-235.1989.
- Gaastra, W. & Lipman, L. J. A. (2010). *Capnocytophaga canimorsus*. *Veterinary Microbiology*, 140 (3): 339-346. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.040>.
- Hess, E., Renzi, F., Koudad, D., Dol, M. & Cornelis, G. R. (2017). Identification of Virulent *Capnocytophaga canimorsus* Isolates by Capsular Typing. *J Clin Microbiol*, 55 (6): 1902-1914. doi: 10.1128/jcm.00249-17.
- Kleijnen-Grebien, B., Boorsma, S., Stals, F. S. & van Schelven, R. (2008a). [Fatal case of sepsis with *Capnocytophaga canimorsus* after a minor dog bite]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 152 (34): 1882-5.
- Kleijnen-Grebien, B., Boorsma, S., Stals, F. S. & van Schelven, R. (2008b). Fatale afloop van een sepsis met *Capnocytophaga canimorsus* na een triviale hondenbeet. *Ned Tijdschr Geneesk*. doi: 152:1882-5.
- Lion, C., Escande, F. & Burdin, J. C. (1996). *Capnocytophaga canimorsus* infections in human: Review of the literature and cases report. *European Journal of Epidemiology*, 12 (5): 521-533. doi: 10.1007/BF00144007.

- Mally, M., Shin, H., Paroz, C., Landmann, R. & Cornelis, G. R. (2008). *Capnocytophaga canimorsus*: a human pathogen feeding at the surface of epithelial cells and phagocytes. *PLoS Pathog*, 4 (9): e1000164. doi: 10.1371/journal.ppat.1000164.
- Prasil, P., Ryskova, L., Plisek, S. & Bostik, P. (2020). A rare case of purulent meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus* in the Czech Republic - case report and review of the literature. *BMC Infect Dis*, 20 (1): 100. doi: 10.1186/s12879-020-4760-2.
- Sakai, J., Imanaka, K., Kodana, M., Ohgane, K., Sekine, S., Yamamoto, K., Nishida, Y., Kawamura, T., Matsuoka, T., Maesaki, S., et al. (2019). Infective endocarditis caused by *Capnocytophaga canimorsus*; a case report. *BMC Infect Dis*, 19 (1): 927. doi: 10.1186/s12879-019-4492-3.
- Shin, H., Mally, M., Kuhn, M., Paroz, C. & Cornelis, G. R. (2007). Escape from Immune Surveillance by *Capnocytophaga canimorsus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 195 (3): 375-386. doi: 10.1086/510243.
- Suzuki, M., Kimura, M., Imaoka, K. & Yamada, A. (2010). Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, 144 (1): 172-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.001>.
- Umeda, K., Hatakeyama, R., Abe, T., Takakura, K.-I., Wada, T., Ogasawara, J., Sanada, S.-I. & Hase, A. (2014). Distribution of *Capnocytophaga canimorsus* in dogs and cats with genetic characterization of isolates. *Veterinary Microbiology*, 171 (1): 153-159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.023>.
- Wold, A. & L'Abée-Lund, T. (2012). *Metode-kompendiet. Oversikt over metoder og tester som benyttes i bakteriologiskurs og aktiv tjeneste for veterinærstudenter ved NVH*. Norges veterinærhøgskole.

Vedlegg

Vedlegg 1: E-post

Forespørsel om deltakelse i prosjektet. Sendt på e-post til studenter ved Veterinærhøyskolen 06.10.22. Publisert i det ukentlige nyhetsprøvet til de ansatte ved Veterinærhøyskolen i uke 41.

Hei!

Jeg og Johanne går sisteåret på veterinærstudiet og skal i forbindelse med fordypningsoppgaven kartlegge forekomsten av bakterien *Capnocytophaga canimorsus* hos norske hunder. Dette er en normalflorabakterie i munnhulen hos hunder og katter.

I denne sammenheng trenger vi din hjelp! Dersom du har tilgang på en hund setter vi enormt pris på om du kan bistå oss med en svaberprøve fra munnhulen dens. Alle hunder er velkomne til å bidra. Du henter og leverer prøvetakings-kit ved servicetorget i Hippocampus i veterinærbygget og vi ordner resten. Du kan hente prøvetakings-kit i uke 43 (24.-28-oktober)

Prøvetakningen må skje mandag 31. oktober og leveres til servicetorget samme dag innen klokken 12.

Svar på denne e-posten dersom du er interessert i å bistå med forskningen.

Mvh Johanne Fjellså og Kaja Ilbråten, kull 17

Vedlegg 2: Informasjonsskriv

Informasjon angående prøvetaking for *Capnocytophaga canimorsus*

Capnocytophaga canimorsus er en bakterie som normalt forekommer i munnhulen hos hunder og katter. Som oftest er den helt ufarlig for mennesker, men noen dyr har en mer sykdomsfremkallende variant som ved bittskade kan føre til sykdom hos mennesker.

Gjennom vårt fordypningsprosjekt som en del av vårt siste studieår på veterinærhøgskolen ønsker vi å kartlegge forekomsten av denne bakterien hos norske hunder. Det er gjort lite studier på denne bakterien i Norge, og i samarbeid med Zürich er det et mål om å lage en internasjonal genbank for bakterien.

Vi setter pris på at du ønsker å hjelpe oss i vårt forskningsprosjekt.

I dette kittet har du fått med en svaber for å ta en prøve fra din hund. Denne prøven skal tas fra munnhulen slik at vi får en prøve av spyttet.

Slik gjør du:

1. Åpne opp svaberen (IKKE ta på selve svaberenden, denne skal holdes ren for prøvetaking)
2. Plasser svaberen på innsiden av kinnnet til hunden din og gni den frem og tilbake noen ganger til du føler du har fått med noe prøvemateriale.
3. Plasser svaberen i beholderen som følger med og sett på korken.
4. Prøven oppbevares kjølig frem til levering.

Vedlegg 3: Spørreskjema

Spørreskjema for prøvetaking av *Capnocytophaga canimorsus*

Fyll ut dette spørreskjemaet og lever det tilbake sammen med svaberprøve.

Prøvetakingsdato: _____

Fødselsdato hund: _____

Rase: _____

Kjønn (sett ring rundt riktig alternativ): kastret hannhund / intakt hannhund / intakt tisper / sterilisert tisper

Nr.	Spørsmål:	JA	NEI
1)	Står hunden på faste medisiner?		
1a)	Hvis ja, hvilke medisiner?		
2)	Har hunden fått antibiotika siste 28 dager?		
3)	Har hunden vært i utlandet siden april 2022?		
3a)	Hvis ja, i hvilket/hvilke land?		
4)	Hvis tisper, har hun hatt kull tidligere?		
5)	Er hunden født i Norge?		

Vedlegg 4: Oversikt over svar på spørreskjema

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Nr.	Prøvetakingsdato	Dyrkningsdato	Alder	Rase	Kjønn	Faste medisiner	Hvilke medisiner?	Antibiotika siste 28 dager?	Utlendet siden April 2022?	Hvilket land?	Tispe, kull tidligere?	Født i Norge?	Påvist?
1	30.10.2022	31.10.2022	0,5	Drever	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
2	30.10.2022	31.10.2022	3,5	Eurasier	Tispe	Nei	Nei	Nei	Ja	Danmark	Nei	Ja	Nei
3	30.10.2022	31.10.2022	5,5	Jakt labrador	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
4	30.10.2022	31.10.2022	9	Engelsk springer spaniel	Hannhund	Ja	Prednisolon	Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
5	30.10.2022	31.10.2022	2,5	Norsk grå eighund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
6	30.10.2022	31.10.2022	8,5	Jämthund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei
7	30.10.2022	31.10.2022	1	Golden Retriever	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
8	30.10.2022	31.10.2022	3,5	Jämthund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
9	30.10.2022	31.10.2022	6,5	Blandingshund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
10	30.10.2022	31.10.2022	12,5	Amerikansk Cocker spaniel	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
11	31.10.2022	31.10.2022	4,5	Engelsk cocker spaniel	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
12	31.10.2022	31.10.2022	0,5	Min. Australian Shepard	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
13	31.10.2022	31.10.2022	1,5	Blandingshund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
14	31.10.2022	31.10.2022	1,5	Blandingshund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
15	31.10.2022	31.10.2022	5,5	Blandingshund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
16	31.10.2022	31.10.2022	7,5	Chesapeake bay retriever	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
17	31.10.2022	31.10.2022	3,5	Cocker spaniel	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
18	31.10.2022	31.10.2022	2,5	Border collie	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
19	31.10.2022	31.10.2022	5,5	Portugalsk vannhund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
20	31.10.2022	31.10.2022	0,5	Border collie	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
21	31.10.2022	31.10.2022	4	Hovawart	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
22	31.10.2022	01.11.2022	9	Shetland sheepdog	Hannhund	Ja	Levotyrosinatrium	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
23	31.10.2022	01.11.2022	4	Fransk bulldog griffon	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
24	31.10.2022	01.11.2022	0,5	Blandingshund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
25	31.10.2022	01.11.2022	3,5	Pointer	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
26	31.10.2022	01.11.2022	2	Dvergshnauer	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
27	31.10.2022	01.11.2022	6	Blandingshund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
28	31.10.2022	01.11.2022	3,5	Dunker	Hannhund	Ja	Ciklosporin (øyesalve)	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
29	31.10.2022	01.11.2022	6,5	Blandingshund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei
30	31.10.2022	01.11.2022	1,5	Dansk-svensk gårdshund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
31	31.10.2022	01.11.2022	9,5	Strikåret vorsteh	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
32	31.10.2022	01.11.2022	3,5	Border collie	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei
33	31.10.2022	01.11.2022	5,5	Blandingshund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
34	31.10.2022	01.11.2022	1	Finsk Lapphund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
35	31.10.2022	01.11.2022	8	Rottweiler	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
36	31.10.2022	01.11.2022	1,5	Norsk grå eighund	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
37	31.10.2022	01.11.2022	7,5	Bichon Havanais	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
38	31.10.2022	01.11.2022	3	Border collie	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
39	31.10.2022	01.11.2022	2,5	Storpuddel	Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
40	01.11.2022	01.11.2022	1	Blandingshund	Tispe	Ja	Prednisolon, paracetamol	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
41	01.11.2022	01.11.2022	6,5	Boston terrier	Hannhund	Ja	Oklacitrib (tabl.), hydrokortisonaceponat	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
42	01.11.2022	01.11.2022	2,5	Boston terrier	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
43	01.11.2022	01.11.2022	11		Tispe	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
44	01.11.2022	01.11.2022	0,5	Blandingshund	Hannhund	Nei	Nei	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei

Fjellså og Ilbråten – *Capnocytophaga canimorsus*

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
45	114	01.11.2022	10	Boston terrier	Hannhund	Ja		Nei	Nei			Ja	Nei
46	32	31.10.2022	7,5	Dansk-svensk gårdshund	Tipe	Ja	Gabapentin	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
47	123	01.11.2022	0,5	Labrador retriever	Hannhund	Nei	Ciklosporin (tabl.), immunvaksine	Nei	Nei			Ja	Nei
48	33	01.11.2022	7	Dansk-svensk gårdshund	Hannhund	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
49	111	01.11.2022	0,5	Whippet	Hannhund	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
50	117	01.11.2022	1,5	Isk-setter	Nei	Nei		Nei	Ja	Sverige		Ja	Nei
51	182	01.11.2022	3,5	Whippet	Tipe	Nei		Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
52	181	01.11.2022											Nei
53	126	01.11.2022	3	Golden Retriever	Tipe	Nei		Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
54	13	01.11.2022	3	Hvit glieterhund	Hannhund	Nei		Nei	Nei		Ja	Ja	Nei
55	108	01.11.2022	6	Shar pei	Tipe	Ja	østriol, kolkisin	Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
56	110	01.11.2022	1	Shar pei	Tipe	Nei		Nei	Nei		Nei	Nei	Nei
57	93	01.11.2022	1	Blandingshund	Hannhund	Ja	Lamisil (krem), desloratadin	Ja	Ja	Danmark, Sverige		Nei	Nei
58	90	01.11.2022	12,5	Toller	Tipe	Nei		Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
59	100	01.11.2022	7,5	Cavalier King Charles spaniel	Tipe	Nei		Nei	Nei	Sverige		Ja	Nei
60	99	01.11.2022	9	Cavalier King Charles spaniel	Tipe	Nei		Ja	Ja			Ja	Nei
61	97	01.11.2022	1	Blandingshund	Tipe	Ja	Lamisil (krem), diphenhydramin	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
62	104	31.10.2022	4	Amerikansk cocker	Hannhund	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
63	105	01.11.2022	3,5	Schäfer	Hannhund	Ja	Oktaacitinib, desloratadin, metylprednisolon, allergivaksine	Nei	Nei			Ja	Nei
64	101	01.11.2022	5,5	Engelsk setter	Tipe	Ja	Lokivetmab (injeksjon)	Nei	Ja	Danmark, Sverige	Nei	Ja	Nei
65	118	01.11.2022	0,5	Shetland sheepdog	Nei	Nei		Nei	Nei	Sverige		Nei	Nei
66	113	01.11.2022	7,5	Shetland sheepdog	Nei	Nei		Nei	Nei			Nei	Nei
67	115	01.11.2022	1	Labrador retriever	Hannhund	Nei		Nei	Nei	Danmark		Ja	Nei
68	31	21.11.2022	3	Cocker spaniel	Tipe	Nei		Nei	Ja			Ja	Nei
69	34	21.11.2022	12,5	Amerikansk cocker spaniel	Tipe	Ja	cytopint injeksjon	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
70	130	21.11.2022	0,5	Cocker spaniel	Tipe	Nei		Nei	Nei	Danmark		Nei	Nei
71	127	21.11.2022	0,5	Stor puddel	Hannhund	Nei		Nei	Ja	Sverige		Ja	Nei
72	206	21.11.2022		Engelsk setter	Tipe	Ja	desloratadin (tabl)	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
73	208	21.11.2022	1,5	Dansk-svensk gårdshund	Tipe	Nei		Nei	Ja	Sverige		Ja	Nei
74	210	21.11.2022	9,5	Labrador	Hannhund	Ja		Nei	Ja	Sverige		Nei	Nei
75	128	21.11.2022	0,5	Cocker spaniel	Tipe	Nei		Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
76	211	21.11.2022	2,5	Labrador	Hannhund	Nei		Nei	Ja	Sverige		Nei	Nei
77	125	21.11.2022	5,5	Labrador retriever	Tipe	Nei		Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
78	60	20.02.2023	3,5	Hvit glieterhund	Hannhund	Nei		Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
79	79	20.02.2023	1	Australsk glieterhund	Hannhund	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
80	69	20.02.2023	2	Norsk Lundehund	Hannhund	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
81	78	20.02.2023	3,5	Cocker spaniel	Tipe	Ja	Meloksikam, gabapentin	Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei
82	59	20.02.2023	1	Golden Retriever (jakttype)	Hannhund	Nei		Nei	Nei			Ja	Nei
83	67	20.02.2023	3	Borzoï	Tipe	Nei		Nei	Nei			Nei	Nei
84	64	20.02.2023	9	Engelsk setter	Hannhund	Ja	Bedinvetmad	Nei	Nei			Ja	Nei
85	54	20.02.2023	1	Stor puddel	Hannhund	Nei		Nei	Ja	Sverige		Ja	Nei
86	65	20.02.2023	2,5	Engelsk setter	Tipe	Ja	desloratadin (tabl)	Nei	Nei		Nei	Ja	Nei
87	55	20.02.2023	1,5	Dansk-svensk gårdshund	Tipe	Nei		Nei	Ja	Sverige	Nei	Ja	Nei

Vedlegg 5: Metadata til vedlegg 4

	A	B
1	Nr.	Nummer på svaberprøve
2	Prøvetakingsdato	dd.mm.åååå
3	Alder	Oppgis i hele og halve år
4	Rase	Rase på hunden
5	Kjønn	Intakt tisper, sterilisert tisper, intakt hannhund, sterilisert hannhund, kjemisk kastrert hannhund
6	Faste medisiner?	Ja/Nei
7	Hvilke medisiner?	Navn på virkestoff
8	Antibiotika siste 28 dager	Ja/Nei
9	Utlandet siden april 2022?	Ja/Nei
10	Hvilke land?	Navn på land
11	Kull tidligere?	Ja/Nei, dersom svaret er tisper på kjønn
12	Født i Norge?	Ja/Nei

Vedlegg 6: Oversikt over resultater fra laboratoriet

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Nummer:	Vekst på agarstål:	Vekst aerobt:	Oksydase	Katalase	Kolonibeskrivelse								
2	1.1.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram-farging	Maltose	Laktose	Sukrose	Raffinose	Indol	ONPG	Påvist:
3	1.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram-negative staver	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
4	2.1.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, mildt konfluierende, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram-negative staver	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
5	2.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, mildt konfluierende, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
6	3.1.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative staver og kokkoide staver (mye materiale)	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	Nei
7	3.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
8	4.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, hvitaktig, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative staver og noen kokkoide staver	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
9	4.2.Ja	Ja	Ja	neg.	neg.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
10	5.1.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
11	5.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
12	6.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver, og noen lengre staver (?)	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
13	6.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver, og noen lengre staver (?)	neg.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
14	7.1.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.								Nei
15	7.2.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.								Nei
16	8.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, hvitaktig, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
17	8.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, hvitaktig, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
18	9.1.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Opak, blank, ikke adherent til mediet, pinpoints-konfluierende, hvitaktig i fargen	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
19	9.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	neg.	Opak, blank, ikke adherent til mediet, pinpoints-konfluierende, hvitaktig i fargen	Gram negative kokkoide staver							Nei
20	10.1.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Opak, blank, hvitaktig, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet.								Nei
21	10.2.Ja	Ja	Ja	neg.	neg.	Opak, blank, hvitaktig, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet.								Nei
22	15.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, mindre blank enn de andre, konfluierende, grå, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
23	15.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, hvitaktig, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
24	17.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver, damer kjeder	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
25	17.2.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
26	22.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, mindre blank enn de andre, konfluierende, grå, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver og noen l kjeder	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
27	22.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Transparant, pinpoints, gråhvite, blanke, ikke adherent til mediet.	Gram negative staver l kjeder (kokkoide?)	pos.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
28	16.1.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
29	16.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Hvit, pinpoints-konfluierende, ikke adherent til mediet, blank	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	Nei
30	14.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet	Gram negative staver l lange kjeder, mulig kokkoide.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
31	14.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative (?) kokkoide staver l lange og korte kjeder??	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
32	11.1.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
33	11.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
34	10.2.1.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Trådtrekende	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
35	10.2.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver l kjeder	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
36	116.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
37	116.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Nei
38	18.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Litt matt, svak hvit, konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negative staver l kjeder (Mulig kokkoide)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
39	18.2.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative (?) kokkoide staver	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
40	18.3.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Hemolyse								Nei
41	91.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negativ(?) kokkoide staver	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
42	91.2.Ja	Ja	Ja	neg.	pos.	Opak, blank, mer hvitaktig, pinpoints - konfluierende, ikke adherent til mediet.	Gram negativ(?) kokkoide staver	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
43	91.3.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.	Gram negative kokkoide staver	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Nei
44	85.1.Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.								Nei
45	85.2.Ja	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.	Blank, hvit med svakt gulsjær, konfluierende, transparent, ikke adherent til mediet.								Nei

Fjellså og Ilbråten – *Capnocytophaga canimorsus*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
46	61,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
47	61,2	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
48	71,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
49	71,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
50	68,1	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
51	68,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
52	77,1	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
53	89,1	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
54	89,2	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
55	86,1	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
56	86,2	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
57	81,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
58	81,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
59	81,3	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
60	72,1	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
61	72,2	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
62	63,1	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
63	63,2	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
64	75,1	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
65	75,2	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
66	83,1	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
67	83,2	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
68	80,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
69	80,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
70	88,1	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
71	88,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
72	66,1	Ja	Ja	neg.	neg.									Nei
73	66,2	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
74	74,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
75	74,2	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
76	82,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
77	82,2	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
78	73,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
79	73,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
80	96,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
81	96,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
82	103,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
83	103,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
84	106,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
85	106,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
86	109,1	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
87	109,2	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei
88	107,1	Ja	Ja	pos.	pos.									Nei
89	107,2	Ja	Ja	neg.	pos.									Nei
90	114,1	Ja	Ja	pos. (svak)	pos.									Nei

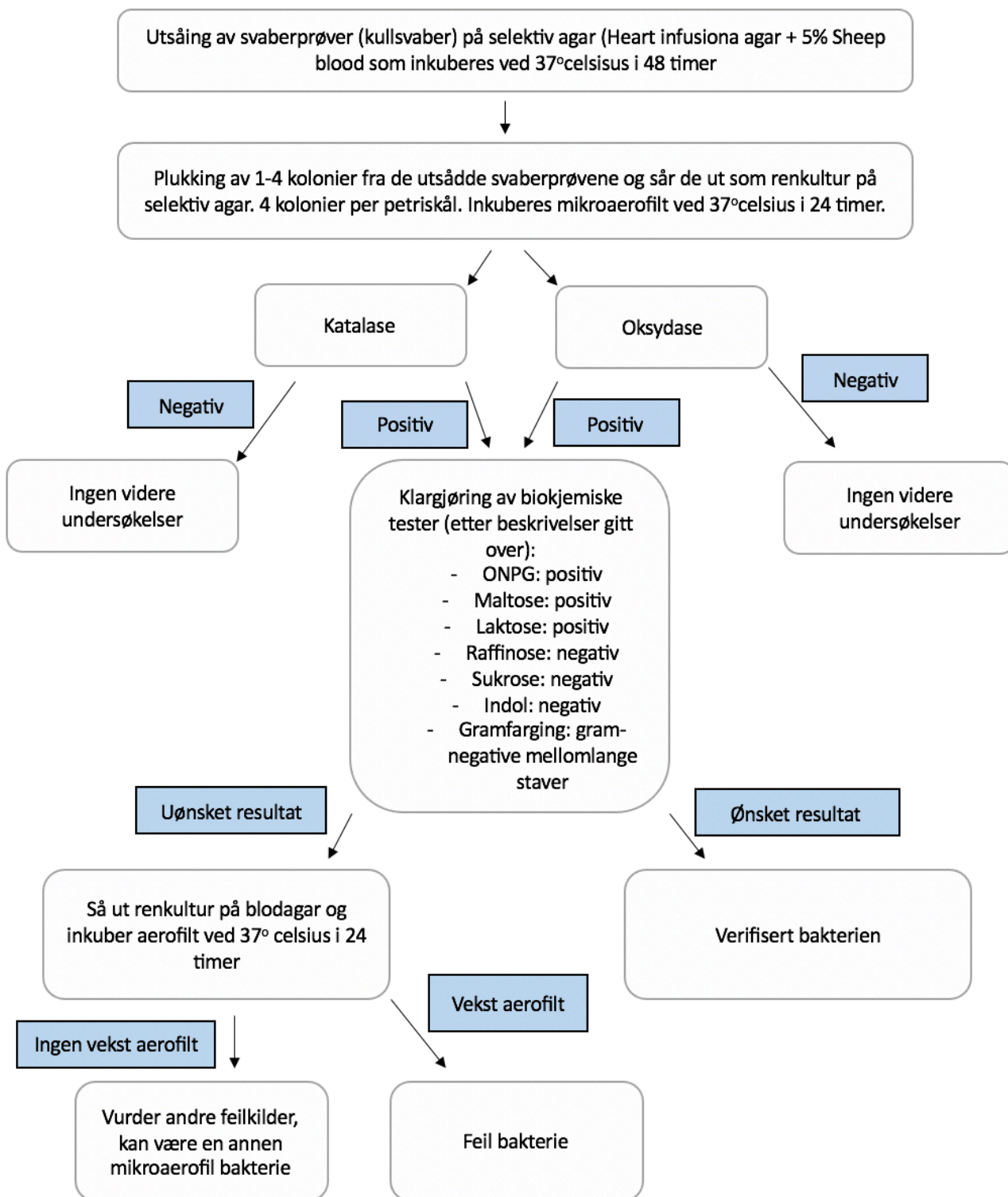
Fjellså og Ilbråten – *Capnocytophaga canimorsus*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
136	31,1 Ja	Ja	Ja	pos.	pos.	transparant, pinpoints, lite veskt etter 48 timer. Litt gråaktig.	Gram negative staver. (Litt kortere enn pos. kontroll)	pos.	neg.	pos.	neg.		neg.	Nei
137	31,2 Ja	Ja	neg.	neg.										Nei
138	31,3 Ja	Ja												Nei
139	31,4 Ja	Ja												Nei
140	34,1 Ja	Ja												Nei
141	34,2 Ja	Ja												Nei
142	34,3 Ja	Ja												Nei
143	34,4 Ja	Ja												Nei
144	130,1 Ja	Ja												Nei
145	Ja	Ja												Nei
146	130,3 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.	Transparant, pinpoints-konfluerende. Litt gråaktig	Gram negative, kokkoide staver (Noen er veldig runde).	neg.	pos.	pos.	neg.		neg.	Nei
147	130,4 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.	Transparant, pinpoints. Litt gråaktig.	Gram negative, staver (korte staver)	neg.	neg.	pos. men	neg.		neg.	Nei
148	127,1 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.	Transparant, pinpoints. Litt gråaktig.	Gram negative, kokkoide staver.	pos.	pos.	pos.	neg.		neg.	Nei
149	Ja	Ja												Nei
150	127,3 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.		Gram negative, kokkoide staver.	pos.	pos.	pos.	neg.		neg.	Nei
151	127,4 Ja	Ja												Nei
152	206,1 Ja	Ja												Nei
153	Ja	Ja												Nei
154	206,3 Ja	Ja												Nei
155	206,4 Ja	Ja												Nei
156	208,1 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.	Transparant, pinpoints-konfluerende. Litt gråaktig	Gram negative staver. (Litt korte)	pos.	pos.	pos.	neg.		neg.	Nei
157	Ja	Ja												Nei
158	208,3 Ja	Ja												Nei
159	Ja	Ja												Nei
160	210,1 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.	Transparant, pinpoints-konfluerende. Litt gråhvite i fargen.	Gram negativ, kokkoide staver. Ligner på kokker, men litt uf neg.	neg.	neg.	neg.	neg.		neg.	Nei
161	Ja	Ja												Nei
162	210,3 Ja	Ja												Nei
163	210,4 Ja	Ja												Nei
164	128,1 Ja	Ja												Nei
165	128,2 Ja	Ja	neg.	neg.	neg.									Nei
166	128,3 Ja	Ja	pos.	pos.	pos.	Transparant, pinpoints-konfluerende. Litt gråaktig	Gram negative staver (nesten kokkoide)	neg.	neg.	pos.	neg.		neg.	Nei
167	128,4 Ja	Ja												Nei
168	211,1 Ja	Ja												Nei
169	211,2 Ja	Ja												Nei
170	211,3 Ja	Ja												Nei
171	211,4 Ja	Ja												Nei
172	125,1 Ja	Ja												Nei
173	125,2 Ja	Ja												Nei
174	125,3 Ja	Ja												Nei
175	125,4 Ja	Ja												Nei
176	Pos. kontr. Ja			pos.	pos.	Konfluerende. Store, feite, litt slimaktig kolonier. Gråfarge med litt lilla skjær. Flate kolonier/utflytete Gram negative staver (litt lange og tynne)	Gram negative staver (litt lange og tynne)	neg.	pos. Men SV/ERT sv neg.		neg.	neg.	neg.	Nei

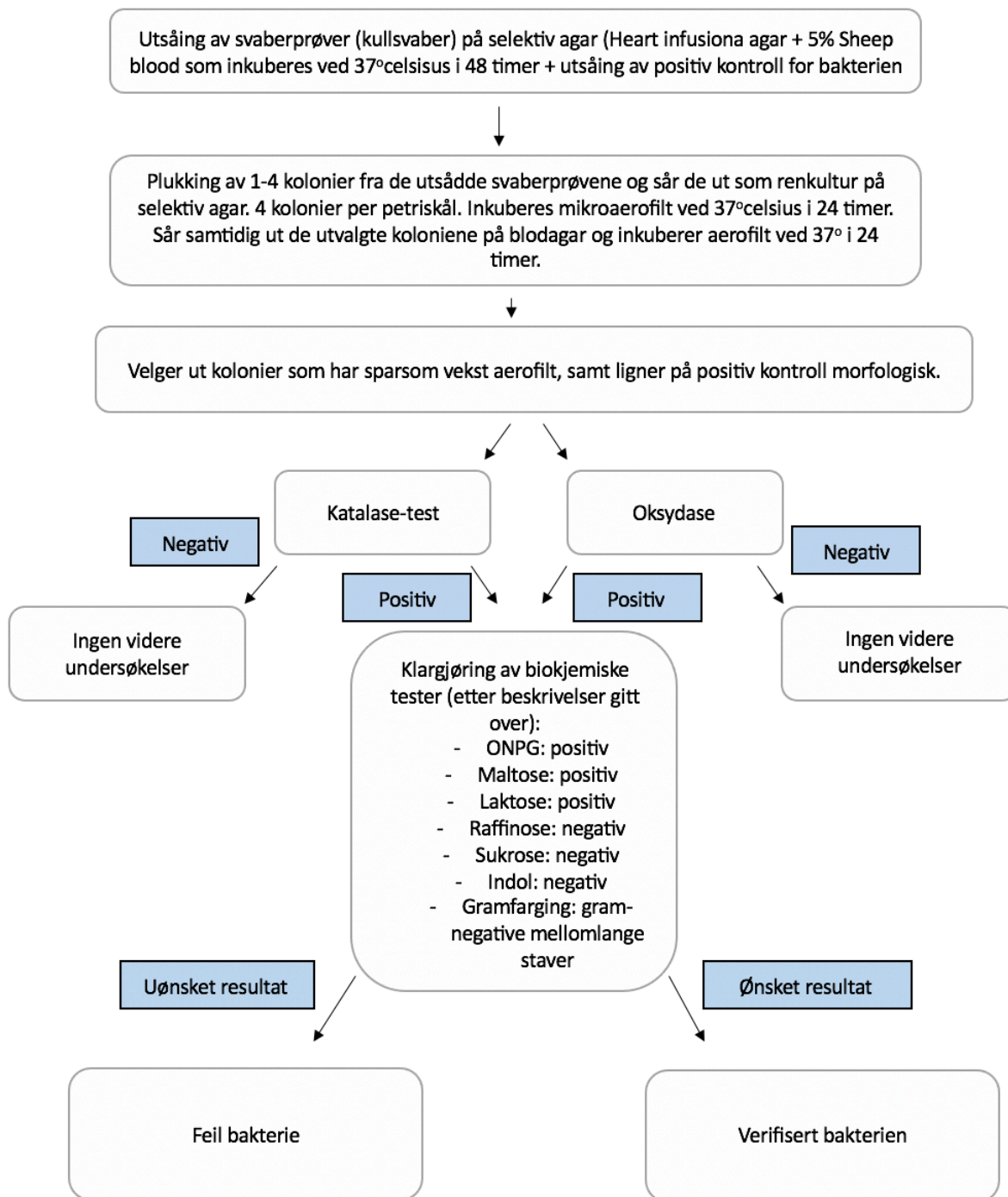
Vedlegg 7: Metadata til vedlegg 6

	A	B
1	Nummer	Svaberprøve, koloninummer
2	Vekst på agarskål	Ja/ nei
3	Vekst aerobt	Ja/ nei
4	Oksydase	Positiv/ svak positiv/ negativ
5	Katalase	Positiv/ negativ
6	Maltose	Positiv/ negativ
7	Laktose	Positiv/ negativ
8	Sukrose	Positiv/ negativ
9	Raffinose	Positiv/ negativ
10	Indol	Positiv/ negativ
11	ONPG	Positiv/ negativ
12	Påvist	Ja/ nei

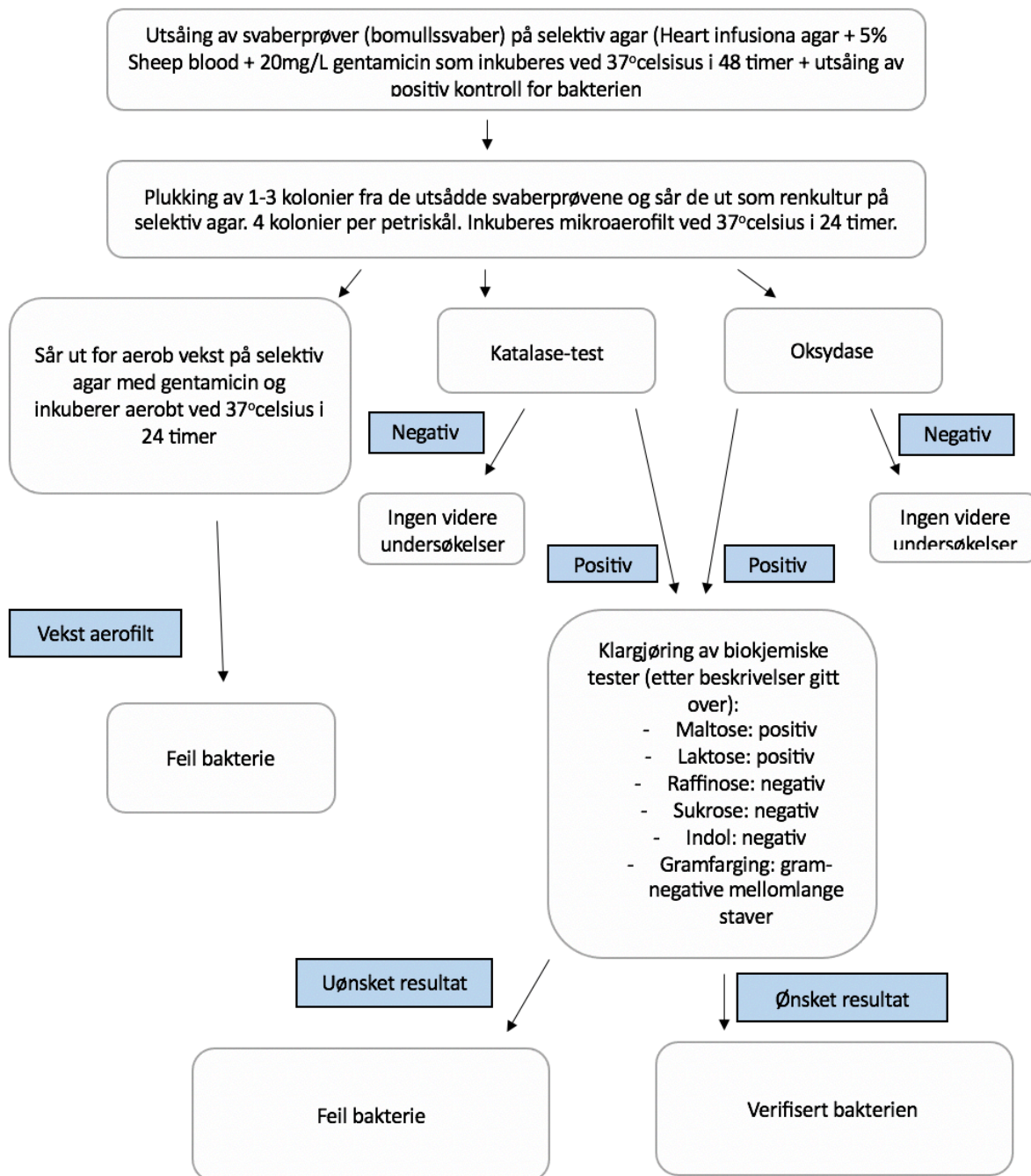
Vedlegg 8: Flytskjema runde 1



Vedlegg 9: Flytskjema runde 2



Vedlegg 10: Flytskjema runde 3





Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

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