

Opptak og utskillelse av antibakterielle midler fra plasma og vev i rognkjeks



Faglig sluttrapport for prosjekt 901468
Mars 2019

Gyri T. Haugland¹, Rita Hannisdal², Karen O. Kverme¹, Marielle Kallekleiv¹,
Kristina Larsen¹, Anita Rønneseth¹, Duncan Colquhoun³, Bjørn-Tore Lunestad²,
Ole B. Samuelsen² og Heidrun I. Wergeland¹.

¹Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen, ²Havforskningsinstituttet,
³Veterinærinstituttet.



INNHALDSFORTEGNELSE

1. Sammendrag	3
1.1. Sammendrag på norsk.....	3
1.2. Summary.....	4
2. Innledning	5
2.1. Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt.....	5
2.2. Prosjektets omfang	6
2.3. Prosjektorganisering.....	7
3. Problemstilling og formål	8
4. Prosjektgjennomføring	9
5. Materiale og metoder	9
5.1. Rognkjeks.....	9
5.2. Tillaging og administrering av fôr.....	9
5.3. Prøvetaking av blod og vevsprøver.....	10
5.4. Analyse av florfenikol og florfenikol-amin i vev og plasma.....	10
5.5. Analyse av flumekin i vev og plasma.....	11
5.6. Analyse av oksolinsyre i vev og plasma.....	11
5.7. Farmakokinetiske analyser.....	11
5.8. Bakterieisolater.....	12
5.9. Bakteriedyrking.....	13
5.10. Bestemmelse av bakterietall.....	13
5.11. Antibakterielle midler.....	13
5.12. Minimum inhiberende konsentrasjon (MIC)-analyse.....	13
5.13. PCR, sekvensering og analyse av gener involvert i resistens.....	14
5.14. Dosestest: atypisk <i>A.sal</i> og <i>Pasteurella</i> sp.....	15
5.15. Smitte med atypisk <i>A.sal</i> og antibakteriell behandling.....	15
5.16. Smitte med <i>Pasteurella</i> sp. og antibakteriell behandling.....	16
5.17. Statistiske analyser.....	17
6. Resultater, diskusjon og konklusjon	18
6.1. Kinetikk analyser etter administrering av florfenikol.....	18
6.2. Kinetikk analyser etter administrering av oksolinsyre og flumekin.....	20
6.3. Sensitivitets-testing av 28 isolater av <i>A. sal</i> , samt <i>V. anguillarum</i> og <i>Pasteurella</i> sp.....	22
6.4. Korrelasjon mellom kinolon-resistens og genmutasjon i <i>gyrA</i>	23
6.5. Dose-test for bestemmelse av smittedose og behandlingsstart.....	24
6.6. Effekt av antibakteriell behandling etter smitte med atypisk <i>A. salmonicida</i>	25
6.7. Effekt av antibakteriell behandling etter smitte med <i>Pasteurella</i> sp.....	26
7. Hovedfunn	27
8. Takk	28
9. Referanser	28
10. Leveranser	29

1. Sammendrag

1.1. Sammendrag på norsk

Rensefisk benyttes nå i økende grad som et biologisk alternativ til kjemiske midler for å fjerne lakselus. Produksjon av rognkjeks er suksessfull, men det er store utfordringer med høy dødelighet pga sykdom. Dagens vaksiner gir ikke fullgod beskyttelse og antallet foreskrivninger av antibakterielle midler til rognkjeks øker uten at det foreligger utarbeidede protokoller for behandling eller kunnskap om opptak og utskillelse av antibakterielle midler fra plasma og vev. **De overordnede målene med prosjektet var å få mer kunnskap om opptak/ utskillelse av antibakterielle midler i rognkjeks og å utarbeide protokoller for effektiv antibakteriell behandling da dette vil øke velferden til rognkjeks og redusere faren for fremvekst av resistente bakterier.** Delmålene var 1) utføre farmakokinetiske analyser for å måle opptak og utskillelse av de tre ulike antibakterielle midlene florfenikol, oksolinsyre og flumekin i plasma og vev fra rognkjeks ved bruk av LC-MS/MS, 2) måle patogene bakteriers sensitivitet overfor de nevnte antibakterielle midlene ved å utføre minimum inhiberende konsentrasjon (MIC)-analyse og 3) utarbeide effektive protokoller for antibakteriell behandling av rognkjeks smittet med atypisk *Aeromonas salmonicida* og *Pasteurella* sp.

MIC og farmakokinetikk-resultater benyttes til å beregne en teoretisk dose for behandling, men det er i tillegg svært viktig å eksperimentelt verifisere at det antibakterielle middelet og den beregnede dosen har effekt i smittet fisk. Resultatene fra kinetikkanalysene viste at tidspunktet for maksimumskonsentrasjon av florfenikol var 24 timer etter oral administrering, mens for flumekin og oksolinsyre var de høyeste konsentrasjonene målt etter 6-12 timer. Halveringstidene som ble målt i dette studiet indikerer at tilbakeholdelsestiden kan bli satt kortere enn 500 døgngrader for alle de tre stoffene. Det ble utført MIC-analyse der vi undersøkte om 28 isolater av *A. salmonicida* var sensitive overfor florfenikol, samt kinolonene oksolinsyre og flumekin. Alle var sensitive for florfenikol, mens noen av de undersøkte isolatene var lite sensitive/resistente for oksolinsyre og flumekin. Rognkjeks som var eksperimentelt smittet med atypisk *A. salmonicida* ble behandlet med florfenikol (2 doser), oksolinsyre og flumekin. Det ble ikke oppnådd ønsket effekt av noen av behandlingene etter smitte med atypisk *A. salmonicida*, men florfenikol (20 mg/kg/dag i 10 dager) var det minst dårlige alternativet. Dødeligheten økte kraftig 17 dager etter endt behandling. For behandling av rognkjeks med atypisk furunkulose, kan en forlenget behandling med florfenikol 20 mg/kg/dag, fra 10 dager til 15 dager være et mulig alternativ, men dette må verifiseres eksperimentelt. Florfenikol 20 mg/kg/dag i 15 dager er vår anbefaling for behandling av rognkjeks med pasteurellose.

Kunnskap om bakteriers sensitivitet overfor ulike antibakterielle midler, kinetikkdata og effektiv behandling av rognkjeks med bakterielle sykdommer er svært viktige for å øke rognkjeksens velferd og overlevelse, og for å unngå at rognkjeks blir bærere av patogene bakterier, samt redusere faren for utvikling av resistente bakterier. Vi har vist at de antibakterielle midlene har ulik effekt på de ulike sykdomsfremkallende bakteriene. Det er derfor viktig å identifisere bakterien og få gjort sensitivitetstesting for å gi mest mulig effektiv behandling og for å hindre at rognkjeks blir bærere av bakteriene fordi sykdommen da raskt kan blusse opp igjen.

1.2. Summary

Since 2012, cleaner fish are increasingly used as a biological alternative for removal of lice from farmed Atlantic salmon. The production is successful, but there are ethical and economic concerns related to high mortality among lumpfish due to bacterial infections. The currently available vaccines do not give full protection and the number of prescriptions of antibacterials to lumpfish increase, despite lack of established protocols for treatment of diseased fish or knowledge about uptake and elimination of antibacterials from tissues and plasma. **In this project, we aimed to improve our knowledge about uptake/elimination of antibacterial agents in lumpfish and establish protocols for efficient antibacterial treatment of atypical furunculosis and pasteurellosis. This is important for the welfare of lumpfish and reduces the risk for development of resistant bacteria.** Our tasks were; 1) Perform pharmacokinetic analyses to measure uptake and elimination of the antibacterial agents florfenicol, oxolinic acid and flumequine from tissue and plasma from lumpfish using LC-MS/MS, 2) Measure the sensitivity of pathogenic bacteria for florfenicol, oxolinic acid and flumequine in minimum inhibitory concentration (MIC) analyses, 3) Establish protocols for antibacterial treatment of lumpfish experimentally challenged with atypical *Aeromonas salmonicida* and *Pasteurella* sp.

MIC and pharmacokinetic data can be used to calculate a theoretical dose for treatment, but as this is only a theoretic dose, it should be verified experimentally that the chosen antibacterial agent and dose has effect on diseased fish. The pharmacokinetic analyses showed that the time point for maximum uptake was 24 h after oral administration for florfenicol, while for oxolinic acid and flumequine the highest concentrations were measured 6-12 h post administration. The half-lives measured in the current study, indicate that the withdrawal time can be shorter than 500 day-degrees for all three antibacterials. In the MIC analyses, the sensitivity of 28 isolates of *A. salmonicida* and *Pasteurella* sp. towards florfenicol, oxolinic acid and flumequine were tested. All the isolates were sensitive for florfenicol, while some of the isolates showed low sensitivity/ were resistant towards oxolinic acid and flumequine. Lumpfish experimentally challenged with atypical *A. salmonicida* were treated with florfenicol (two doses), oxolinic acid and flumequine. None of these treatments was efficient, but florfenicol (20 mg/kg/day in 10 days) showed the most promising results although the mortality increased in this group 17 days after treatment. A prolonged treatment period, from 10 to 15 days with florfenicol 20 mg/kg/day can be a possible alternative for treatment of lumpfish with atypical furunculosis, but this must be verified experimentally. Florfenicol 20 mg/kg/day in 15 days is our recommendation for lumpfish with pasteurellosis.

Knowledge of the sensitivity of bacteria towards antibacterial agents, pharmacokinetic data and efficient treatment of lumpfish is essential to increase the welfare of lumpfish, to reduce the risk that lumpfish become carrier of pathogenic bacteria and to avoid development of antibiotic resistant bacteria. We have shown that florfenicol, oxolinic acid and flumequine have different effect on lumpfish infected with atypical furunculosis and pasteurellosis. It is thus of major importance to identify the bacteria and perform sensitivity testing to ensure efficient antibacterial treatment.

2. Innledning

2.1. Faglig bakgrunn for prosjektet

Oppdrett av rognkjeks startet i småskala i 2011. Fra 2012 har antallet oppdrettede rognkjeks økt fra 0,4 millioner til ca. 40 millioner i 2018 (www.fiskerifirektoratet.no, Walde et al. 2019). For å sikre en bærekraftig bruk av rensefisk i årene fremover er det viktig å bruke oppdrettet fisk fremfor villfanget da det er et estimert behov for ca. 55 millioner rensefisk årlig. Oppdrettet fisk er ønskelig også med hensyn til biosikkerhet for å hindre introduksjon og spredning av smitte i merd, og fordi oppdrett av fisk vil muliggjøre forebygging av sykdom gjennom vaksiner. Ettersom rognkjeks fortsatt er en ny art innen oppdrett er det ikke uventet at det har vært problemer med bakterielle sykdommer – dette var også tilfelle i en tidlig fase av lakseoppdrett – men med bedre rutiner, erfaringer og effektive vaksiner, er ikke lenger bakterielle sykdommer hos laks et stort problem og generelt benyttes det nå svært lite antibiotika i norsk oppdrettsnæring.

Det er i dag stort fokus på rognkjeksens helse og velferd og det arbeides med å utvikle effektive vaksiner (Ellul et al. 2019, Haugland et al., 2018, Rønneseth et al., 2017). De vanligste bakterielle sykdommene er forårsaket av atypisk *A. salmonicida*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas anguilliseptica* og *Vibrio* spp. (Walde et al., 2019, Schouz et al. 2018). Vaksinene er effektive mot vibriose, men rognkjeks er også utsatt for vibrio-infeksjon i tidlige faser før den vaksineres. Det har vist seg at det er vanskeligere å utvikle effektive vaksiner mot atypisk *A. salmonicida* da dette er en svært heterogen bakteriegruppe og det arbeides med å finne gode vaksinekandidater, dvs. isolater som gir god beskyttelse mot de ulike varianter av de atypiske isolatene. Uttesting av vaksiner inneholdende atypisk *A. salmonicida* har vist lovende resultater (Rønneseth et al., 2017), men det gjenstår fortsatt arbeid før man har en god vaksine (Nordstrand et al., 2017). Bakterien som forårsaker pasteurellose hos rognkjeks, *Pasteurella* sp., er forskjellig fra *Pasteurella skyensis* fra laks (Alarcon et al, 2016). Det arbeides med å finne ut om *Pasteurella* sp. fra rognkjeks bør inkluderes i vaksinene ettersom pasteurellose er en av de bakterielle sykdommene som hyppigst forårsaker dødelighet hos rognkjeks (Ellul et al. 2019)

Antallet foreskrivninger av antibakterielle midler til rognkjeks har vært økende de siste årene (Grave & Helgesen, 2018). Det er ikke uventet tatt i betraktning den store økningen i antall produsert fisk, men det er svært alvorlig at man ikke har kunnskap om hvilke antibakterielt middel og doser som er effektive til behandling av ulike bakterielle sykdommer, dette på tross av at det er kommersielt medisinfôr tilgjengelig for rognkjeks. Dette betyr at antibiotika foreskrives uten at det foreligger faglig dokumentert behandlingseffekt. Konsekvensene for sub-optimal behandling er alvorlige pga redusert fiskevelferd, samt at det kan resultere i fisk som er bærere av patogene bakterier, og sykdommen kan

da lett blusse opp senere dersom fisken blir utsatt for stress eller andre uheldige forhold, både under produksjon og etter utsett i merd. Det er viktig at rognkjeks ikke blir bærere av patogene bakterier for dens egen del, men også fordi det per i dag er lite kunnskap om overføring av sykdommer mellom rognkjeks og laks, og mellom rognkjeks og leppefisker. I tillegg vil det, ved gjentatte behandlinger med sub-optimal behandling, øke faren for utvikling av bakterier som er mindre sensitive eller resistente overfor antibakterielle midler. Dette FHF-prosjektet bygger på tidligere erfaringer med utarbeidelse av smitte modeller for rognkjeks, FHF-prosjekt 900818 AP3: Tapsårsaker og smitte modeller/Utvikling av smitte modell med *Pasteurella* sp. (Rønneseth et al., 2014a, b), og koordineres med NFR-prosjektet «The cleaner-fish lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): Immunity, diseases and Health» (Lumpfish, prosjekt 244148).

2.2. Prosjektets omfang

Farmakokinetikk.

Prosjektet innbefattet farmakokinetiske data for tre antibakterielle midler: florfenikol, oksolinsyre og flumekin. Matriser som skulle analyseres var plasma, hodenyre, lever og muskel. I tillegg til nullprøven (fisk som ikke har fått medisinfor), var det ni uttak (Tabell 1). Tidspunktene ble bestemt ut fra pilotforsøk, der det ble analysert prøver etter 24 timer og etter 5 og 7 dager. Per tidspunkt ble det tatt prøver fra 6 fisker. Det ble utarbeidet nye protokoller for homogenisering av vev, og nye protokoller for analyser av de tre antibakterielle midlene på LC-MS/MS. LC-MS/MS er en metode for nøyaktig bestemmelse av konsentrasjonen av antibakterielle midler i en prøve.

Sensitivitetstesting.

For sensitivitetstesting, ble minimum inhiberende konsentrasjon (MIC)-analyser utført. Analysen innbefattet 28 isolater av *A. salmonicida* (Tabell 2), *V. anguillarum* og *Pasteurella* sp. (alle isolert fra syk rognkjeks) og tre antibakterielle midler (Tabell 3). Det ble også undersøkt om tilstedeværelse av A-laget påvirker MIC fordi A-laget er et proteinlag som dekker bakteriens overflate og kan derfor hindre opptak og effekt. I tillegg ble to gener som ofte er involvert i kinolonresistens, *gyrA* og *parC*, sekvensert for å se om det var korrelasjon mellom resistens og genmutasjoner.

Antibakteriell behandling av rognkjeks.

I hvert av behandlingsforsøkene var det 4 behandlingsgrupper bestående av 3 parallelle kar med 30 fisk pr kar. I tillegg var det en gruppe med kontrollfisk som ble smittet, men ikke fikk behandling (4 parallelle kar, 30 fisker pr kar). To antibakterielle behandlings-forsøk ble gjennomført; i Forsøk 1 ble

rognkjeks smittet med atypisk *A. salmonicida* og i Forsøk 2 ble rognkjeks smittet med *Pasteurella* sp. (begge isolert fra rognkjeks). Hvert forsøk innbefattet 480 fisker fordelt på 16 kar, n= 30 fisk per kar. I hvert forsøk var det kontrollfisker (smittet, ikke-behandlet) og 4 behandlingsgrupper. For hver behandlingsgruppe var det 3 parallelle kar (se Fig. 1 og 2), mens for kontrollgruppen var det 4 parallelle kar. Forsøkene innbefattet kommersielt fôr med oksolinsyre og florfenikol, samt at i Forsøk 1 ble det også benyttet fôr med flumekin, som vi laget selv.

2.3. Prosjektorganisering

Prosjektleder:

Heidrun Wergeland (UiB) Administrativt ansvarlig

Prosjektgruppe:

Gyri T. Haugland (UiB): Ansvarlig for gjennomføring av prosjektet, godkjenninger fra mattilsynet og koordinering med NFR-prosjektet (244148).

Ole B. Samuelsen (HI): Ansvarsområde farmakologi

Rita Hannisdal (HI): Ansvarlig for gjennomføring av de kjemiske analysene

Bjørn Tore Lunestad (HI): Ansvarsområde kjemiske analyser av antibakterielle midler

Masterstudenter som har deltatt:

Karen Obrestad Kverme (2017)

Marielle Kallekleiv (2018)

Kristina Larsen (innlevering 01.06.2019)

Styringsgruppe medlemmer i tillegg til prosjekt medarbeidere :

Leif Rune Pedersen (Daglig leder Erko Seafood)

Vidar Vold/ Pål Skjold (Lerøy)

Representant FHF:

Eirik Sigstadsto

3. Problemstilling og formål

Det er store utfordringer med høy dødelighet blant rognkjeks som følge av bakterielle infeksjoner og antall foreskrivninger til rognkjeks har økt de siste årene. På tross av dette, og på tross av at det er to kommersielt tilgjengelige medisiner til rognkjeks, var det, før oppstarten av prosjektet, ingen utarbeidede protokoller for behandling av rognkjeks med antibakterielle midler eller kunnskap om opptak og utskillelse av antibakterielle midler fra plasma og vev i rognkjeks. **Det overordnede målet med prosjektet var derfor å få bedre kunnskap om antibakterielle midler og rognkjeks.** Vi ønsket å få kunnskap om opptak og utskillelse av de antibakterielle midlene florfenikol, oksolinsyre og flumekin fra plasma og vev hos rognkjeks. Kinetikkdataene vil, sammen med MIC-verdier, kunne brukes til å beregne teoretiske doser som er nødvendig for behandling av rognkjeks. Videre vil kinetikkdataene danne et viktig grunnlag for beregning av tilbakeholdelsestid. Selv om rognkjeks ikke er en matfisk per i dag, kan en ikke utelukke at den kan bli det i fremtiden. I tillegg bør tilbakeholdelsestid overholdes før utsett i sjø da det ikke kan utelukkes at rognkjeks i noen tilfeller kan bli spist av laks i merd. Selv om man kan teoretisk beregne effektive doser til behandling, er det viktig å bekrefte dette eksperimentelt. Vi hadde i tidligere forsøk utarbeidet protokoller for effektiv behandling av rognkjeks med vibriose og målet for FHF-prosjektet var å undersøke om de antibakterielle midlene og dosene også var effektive mot atypisk *A. salmonicida* og *Pasteurella* sp. Utarbeidelse av effektiv behandling av rognkjeks med antibakterielle midler er svært viktig da dette vil øke fiskens velferd og redusere faren for fremvekst av resistente bakterier.

Prosjektet var delt inn i tre deler:

- Farmakokinetiske analyser for å undersøke opptak og utskillelse av de antibakterielle midlene florfenikol, oksolinsyre og flumekin i plasma, hodenyre, lever og muskel.
- Sensitivitetstesting av 28 isolater av *A. salmonicida*, samt *Vibrio anguillarum* og *Pasteurella* sp. for tre antibakterielle midler
- Antibakteriell behandling av rognkjeks etter eksperimentell smitte med atypisk *A. salmonicida* og *Pasteurella* sp.

Forventet nytteverdi:

- Rognkjeksprodusenter: Øke overlevelse og velferd for fisk i oppdrett. Dette vil bidra til sikrere og større produksjon, og vil ha en økonomisk gevinst.
- Fiskehelsebiologer og veterinærer: Skaffe faglig grunnlag for foreskrivning av antibakterielle midler til rognkjeks

- Samfunnsnytte: unngå fremvekst og spredning av resistente bakterier
- Dyrevelferd: fremskaffe effektiv behandling for å unngå sykdom, lidelse og død hos rognkjeks
- Mattilsynet: tilbakeholdelsestid etter antibakteriell behandling.

Alle faglige leveranser ifølge tilsagnsbrev er levert.

4. Prosjektgjennomføring

Prosjektet ble gjennomført i perioden nov 2017 til mars 2019. Tre masterstudenter har vært involvert i prosjektet; Karen O. Kverme (2017), Marielle Kallekleiv (2018) og Kristina Larsen (2019). Mastergradsarbeidene har vært utført under veiledning av Gyri T. Haugland, Ole B. Samuelson, Duncan J. Colquhoun og Heidrun I. Wergeland. Smitte- og behandlingsforsøkene, samt kinetikkforsøkene, ble utført hos Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB). Generelt laboratoriearbeid ble utført på UiB, mens de farmakokinetiske analysene ble utført på HI (tidligere NIFES). Godkjenning for å bruke rensstans og godkjenning for å lage medisinfôr selv, ble gitt av mattilsynet. Godkjenning for å utføre dyreforsøkene ble også gitt av mattilsynet. FOTS-ID: 10178 og 14129.

5. Materialer og metoder

5.1. Rognkjeks

Uvaksinert rognkjeks ble levert av Vest Aqua base (Stord) til Industrielaboratoriet i Bergen (ILAB). Hodenyrevev fra 15 fisker var på forhånd undersøkt for patogene bakterier (*V. anguillarum* O1, atypisk *A. salmonicida*, *Pasteurella*). Hos ILAB ble fisken holdt i 500 L tanker. Vanntemperaturen av 12°C, salinitet på 34‰ og et lysregime med 12 timer lys: 12 timer mørke. Vanngjennomstrømning var 300-400 L per time og avløpsvannet hadde et minimum oksygenivå på 77%. Fiskene i det første forsøket ble føret med Gemma Silk (1.5 mm), mens i det andre forsøket fikk fiskene Clean Assist (1.5 mm). Medisinføret hadde samme bærer som det ordinære føret. Fiskene i kinetikkforsøket var 113.5 ± 25 g og 11.7 ± 1.0 cm. Fiskene som ble benyttet i smitte- og behandlingsforsøkene var i forsøkene 38.9 ± 11.6 g og 8.9 ± 1.0 cm.

5.2. Tillaging og administrering av medisinfôr

Medisinføret benyttet til oral administrering var Amber Neptun (1.5 mm) inneholdende 2 g aktiv florfenikol (4 g Aquaflor premix, Intervet/ Schering Plough Animal Health) per kg fôr eller 5 g

oksolinsyre per kg fôr. Medisinfôret med flumekin ble laget på laboratoriet ved å lage en premiks av flumekin og glukose (1:1) og blande godt med fôrpelletter. Etter tillaging, ble flumekinfôret analysert med LC-MS/MS og bekreftet at det inneholdt 5 g flumekin per kg fôr. Før administrering ble fôrpelletene fortynnet 1:1 med sterilt vann (Sigma), tilsatt i gentleMACS C rør og homogenisert i en GentleMACS homogenisator (Miltenyi Biotec). Fôrpastaen ble administrert via en silikonslange og en sprøyte. Alle fiskene ble veiet og fikk mengde fôr tilsvarende 10 mg florfenikol per kg fisk. Fiskene var blitt sultet i 48 timer før oral administrering av fôret.

5.3. Prøvetaking av blod og vevsprøver

Før administrering av medisinfôr ble det tatt ut prøver fra 6 fisker (T=0). Fiskene ble avlivet med slag mot hodet og prøver ble tatt av blod, muskel, hodenyre og lever. Blodprøvene ble tatt fra vena caudalis ved å bruke 1 ml sprøyte og overført til ikke-heparinerte rør. Rørene ble sentrifugert ved 2000 x g i 10 minutter og plasma ble overført til eppendorf-rør. Etter administrering av medisinfôr, ble fire grupper à 6 fisker plassert i individuelle tanker (15 L med gjennomstrømming) for de fire første tidspunktene, for å sikre en mest mulig nøyaktige målinger. De resterende fiskene ble overført til en 500 L tank. Prøvetidspunkter er oppgitt i Tabell 1. Det ble tatt prøver fra 6 fisker fra hvert tidspunkt. Alle prøvene ble frosset ned umiddelbart og lagret ved -20°C frem til de ble analysert.

Tabell 1. Oversikt over tidspunkt for uttak av prøver til kinetikkanalyser etter oral administrering av medisinfôrene florfenikol, oksolinsyre og flumekin.

Uttak	Antall fisk (n=)	Tidspunkt Florfenikol (t)	Tidspunkt Oksolinsyre (t)	Tidspunkt Flumekin (t)
1	6	nullprøve	nullprøve	nullprøve
2	6	3	3	3
3	6	6	6	6
4	6	12	12	12
5	6	24	24	24
6	6	72	48	48
7	6	120	96	72
8	6	168	144	96
9	6	240	192	120
10	6	336	240	168

5.4. Analyse av florfenikol og florfenikol-amin i vev og plasma

Vevsprøver ble homogenisert i en Fast Prep-24TM5G homogenisator (M:P: Biomedicals) ved bruk av homogeniseringsrør som var fylt med matrix S metallkuler (M:P: Biomedicals). De homogeniserte

vevsprøvene og plasma ble tilsatt en intern standard (florfenikol-d3 og florfenikol amin-d3, Toronto Research Chemicals, Inc.) og ekstrahert med en miks av etylacetat/acetonitril/ ammoniakkløsning (25%)- (49:49:2). Etter vortexing og sentrifugering, ble ekstraktene overført til nye rør og konsentrert under en strøm av nitrogen ved 40°C. Prøvene ble deretter løst i vann/metanol (80:20) og filtrert gjennom et 0.45 µm filter. Analysen ble utført ved bruk av et Agilent 1290 LC-system (Agilent Technologies) koblet til et Agilent 6460 trippel kvadrupol massespektrometer (Agilent Technologies). Analyttene ble separert på en revers fase Agilent C18-kolonne (150 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 µm partikkel størrelse) (Agilent Technologies). Mer detaljert informasjon om analysen er beskrevet i Kverme et al. (manuskript i revisjon). Prosedyre blank, matrise blank, matriseopparbeidet kalibreringskurve og kontroller ble opparbeidet i hver serie. Kvantifiseringsgrensen (LOQ) for florfenikol ble bestemt til 2.0 ng/g i vevsprøvene og 2.0 ng/ml i plasma. For florfenikol-amin, var LOQ-verdiene 10-20 ng/g i vev og 2-4 ng/ml i plasma.

5.5. Analyse av flumekin i vev og plasma

Vevsprøvene ble homogenisert som beskrevet i avsnitt 5.4. En intern standard (flumekin-¹³C3) ble tilsatt de homogeniserte vevs og plasmaprøvene. Analytten ble ekstrahert ved bruk av 0.5% maursyre i acetonitrile. Prøvene ble vortex-mikset og sentrifugert før ekstraktene ble overført til nye rør og konsentrert ved 40°C under en strøm av nitrogen. Prøvene ble løst i vann/metanol (60:40) og filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Prøvene ble analysert med LC-MS/MS som beskrevet over og i Kverme et al. (manuskript in prep). LOQ for flumekin ble bestemt å være 10 ng/g i vev og 10 ng/ml i plasma.

5.6. Analyse av oksolinsyre i vev og plasma

Vevsprøver ble homogenisert som beskrevet i avsnitt 5.4. og analysen av oksolinsyre ble utført som beskrevet for flumekin i avsnitt 5.5, utenom at oksolinsyre d5 ble brukt som internstandard og acetonitril ble brukt som ekstraksjonsmiddel. LOQ for oksolinsyre var 2 ng/g i vev og 2 ng/ml i plasma. Mer detaljer er beskrevet i Kverme et al. (manuskript in prep).

5.7. Farmakokinetiske analyser

Standard farmakokinetiske parameter ble beregnet ved å bruke softwareprogrammet PCNONLIN versjon 4.2 (Statistical Consultants Inc.). For oksolinsyre og flumekin, ble halveringstiden i eliminasjonsfasen ($t_{1/2\beta}$) beregnet ved hjelp av naturlig logaritme (ln) transformerte konsentrasjoner i elimineringsfasen versus tid ved å bruke formelen $t_{1/2} = \ln 2/k$, der k er stigningstallet av regresjonslinjen. Informasjon om valg av beste modell for beregning er gitt i Kverme et al. (manus)

5.8. Bakterieisolater

Alle bakteriene inkludert i studiet var isolert fra syk rognkjeks (Tabell 2). Isolatene var, med unntak av HE1-15, selektert fra Veterinærinstituttet sitt fiskepatogenbakterie-samling. HE1-15 er isolert fra syk rognkjeks i Hordaland. Alle *A. salmonicida* isolatene ble benyttet i MIC-analyse (sensitivitetstesting). I de antibakterielle behandlingsforsøkene ble rognkjeksens smittet med det atypiske *A. salmonicida* isolatet HE1-15 og *Pasteurella* sp., begge isolert fra rognkjeks.

Tabell 2. Oversikt over isolatene som ble inkludert i MIC-analysene.

Bakterieisolat	A-lagstype *	Fenotypisk identifisering	Geografisk opprinnelse
NVI-10236	I	typisk	Sør -Trøndelag
NVI-10259	I	typisk	Nord -Trøndelag
NVI-10263	I	typisk	Nord -Trøndelag
NVI-10461	I	typisk	Nord -Trøndelag
NVI-10543	I	typisk	Møre og Romsdal
NVI-9686	II	atypisk	Nordland
NVI-10544	II	atypisk	Troms
NVI-8317	III	atypisk	Færøyene
NVI-8198	VI	atypisk	Hordaland
NVI-10005	VI	atypisk	Rogaland
NVI-10065	VI	atypisk	Møre og Romsdal
NVI-10239	VI	atypisk	Hordaland
NVI-10251	VI	atypisk	Rogaland
NVI-10284	VI	atypisk	Møre og Romsdal
NVI-10471	VI	atypisk	Rogaland
NVI-10513	VI	atypisk	Sogn og Fjordane
NVI-10539	VI	atypisk	Rogaland
NVI-10548	VI	atypisk	Sør -Trøndelag
NVI-10555	VI	atypisk	Sogn og Fjordane
NVI-10559	VI	atypisk	Møre og Romsdal
NVI-10566	VI	atypisk	Møre og Romsdal
NVI-10586	VI	atypisk	Sør -Trøndelag
HE1 -15	VI	atypisk	Hordaland
NVI-10595	VIII	atypisk	Nord -Trøndelag
NVI-10525	ugruppert	atypisk	Sogn og Fjordane
NVI-10742	ugruppert	atypisk	Finnmark
NVI-11038	ugruppert	atypisk	Møre og Romsdal
NVI-11040	ugruppert	atypisk	Rogaland

* Gulla et al. (2016)

5.9. Bakteriedyrking

Alle *A. salmonicida* isolatene ble dyrket i tryptisk soya buljong (TSB) ved 20°C, 200 rpm til sen eksponentiell fase. For dyrking av atypisk *A. sal* isolatet HE1-15 benyttet til smitte i behandlingsforsøket, ble bakterierien dyrket ved 18°C. Grunnen til det er at de atypiske isolatene, og spesielt de om tilhører gruppe VI, lett mister A-laget ved 20°C. A-laget har betydning for bakteriens virulens og det ble derfor valgt at den ble skulle dyrkes ved 18°C. Tilstedeværelse av A-laget ble bekreftet med proteinanalyse i SDS-PAGE, som beskrevet av Rønneseth et al. (2017). *Pasteurella* sp. ble dyrket i TSB 2% NaCl og kalverserum til sen eksponentiell fase som beskrevet at Ellul et al. (2018).

5.10. Bestemmelse av bakterietall

Antall bakterier i kultur ble bestemt ved bruk av celleteller CASY Modell TT 150 µm (Roche Diagnostic). Til MIC-analyser, ble bakteriene fortynnet til 5×10^6 bakterier/ml, til dosetestene ble det testet ut tre ulike doser; 1×10^5 , 2×10^4 og 4×10^3 bakterier pr ml. For smitte til antibakteriell behandling ble dosene 4×10^3 bakterier/ml for atypisk *A. salmonicida* og 5×10^4 bakterier/ml for *Pasteurella* sp. benyttet.

5.11. Antibakterielle midler

Til sensitivitets-testing ble det benyttet tre antibakterielle midler (Tabell 3). Konsentrasjonsområdet ble bestemt basert på data fra pilotanalyser.

Tabell 3. Oversikt over de antibakterielle midlene og konsentrasjonene inkludert og MIC-analysen

Antibakterielt middel	Laveste konsentrasjon (µg/ml)	Høyeste konsentrasjon (µg/ml)
Florfenikol	0,0001	100
Oksolinsyre	0,000056	30
Flumekin	0,0003	200

5.12. Minimum inhiberende konsentrasjon (MIC)-analyse

Det ble benyttet 96-brønners Brett med rund bunn (Sarstedt AG & Co.). En 2-folds fortynningsrekke med 20 fortynninger ble satt opp for hvert antibakterielt middel (Tabell 3). Tre paralleller pr konsentrasjon. I hver brønn ble 100 µl bakteriesuspensjon (5×10^6 bakterier/ml) blandet med 100 µl antibakterielt middel fortynnet i TSB.

5.13. PCR, sekvensering og analyse av gener involvert i resistens

PCR

Templatet til PCR for å amplifisere opp den kinolonresistensbestemmende regionene (QRDR) av genene *gyrA* og *parC* ble laget ved at 1 ml flytende bakteriekultur ble sentrifugert ved 13000 x rpm i 3 minutter. Pelleten ble resuspendert i 100 µl RNase og DNase-fritt vann, varmebehandlet ved 99°C i 10 min og sentrifugert. Supernatanten ble overført til et nytt eppendorf-rør og lagret ved – 20°C. Primere som ble benyttet til å amplifisere opp QRDR av *gyrA* og *parC* er oppgitt i Tabell 4.

Tabell 4. Primere benyttet til å amplifisere opp QRDR av *gyrA* og *parC*.

Målgen	Navn	Sekvens 5'-3'	PCR-prod. (bp)	Referanse
<i>gyrA</i>	ASGYRA1	CCATGAGCGTGATCGTAGGA	665	Giraud et al., 2004
	ASGYRA2	CTTTGGCACGCACATAGACG		
<i>parC</i>	ASPAGC3	CAGCGGCGCATCATCTAC	418	Giraud et al., 2004 Kallekleiv, 2018
	ASPARC4mod	GAATGTCGGTAGCCATGC		

PCR-reaksjonene (totalvolum 50 µl) inneholdt 0.5 µl Phusion DNA polymerase, 10 µl Phusion HF buffer, 1 µl dNTP (10 mM), 2.5 µl av hver av primerne (10 µM) og 10 µl templat (1:10 fortynnet). Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 98°C i 45 sek i 1 syklus, 30 sykluser av 98°C i 15 sek, 63°C i 30 sek, 72°C i 1 min, og 1 syklus ved 72°C i 10 min. PCR-produktene ble analysert på 1 % agarosegel inneholdende gelred (Biotium). DNA 1 Kb + ladder ble benyttet som molekylvektstandard.

Opprensing av PCR-produkt.

GyrA-produktet ble rensert ved bruk av PCR-rens reagenspakken «GenElute PCR clean-up kit» (Sigma) som beskrevet av produsenten. *ParC*-produktet ble rensert ved bruk av gelekstraksjonsreagenspakken E.Z.N.A. Gel Extraction kit (Omega, bio-tek) ved å følge instruks fra leverandør.

Sanger sekvensering

Sanger sekvensering ble utført i en PCR-maskin Thermal Cycler 2720 (Applied systems) med BigDye Terminator v3.1. og levert til sekvenseringlaboratoriet på høytteknologisenteret i Bergen for sekvensbestemmelse. Reaksjonsblandingen (totalvolum 10 µl) inneholdt 1 µl BigDye Terminator v3.1, 1 µl sekvenseringsbuffer, templat (*gyrA*: 5-20 ng og *parC*: 3-10 ng), 1 µl primer (3.2 pmol) og deretter vann til totalt 10 µl.

Bioinformatiske analyser

Nukleotidsekvensene fra Sanger sekvenseringen ble translert til aminosyresekvenser (<https://web.expasy.org/translate/>) og multipel sekvensanalyse av gyrA og parC (både nukleotid og aminosyre-sekvens) ble utført i programmet UGENE (Okonechnikov et al. 2012).

5.14. Dosestest: atypisk *A. salmonicida* og *Pasteurella* sp.

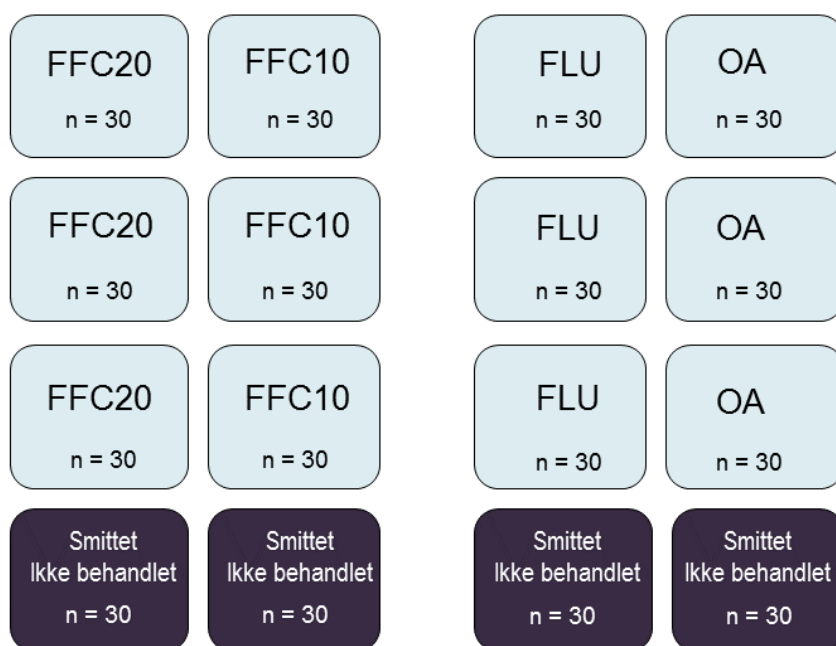
Uvaksinert rognkjeks ($31,5 \pm 6,4$ g og $8,2 \pm 0,6$ cm) ble injisert i.p. med 50 μ l av tre ulike doser av bakterier; 1×10^5 bakt/ml (høy), 2×10^4 bakt/ml (medium) og 4×10^3 bakt/ml (lav). I doseforsøket med atypisk *A.salmonicida* var det 20 fisker per gruppe. I dose-testen med *Pasteurella* sp. var det 16 fisker pr gruppe.

5.15. Smitte med atypisk *A. salmonicida* og antibakteriell behandling

Totalt var det 480 fisker som ble fordelt på 16 kar, dvs 30 fisker pr kar. Alle fiskene ble smittet i.p. med 50 μ l av 4×10^3 bakterier/ml. Kontrollfiskene var smittet, men ikke fikk behandling. Det var 4 grupper med behandling; florfenikol 10 mg/kg/dag, florfenikol 20 mg/kg/dag, oksolinsyre 25 mg/kg/dag og flumekin 25 mg/kg/dag (Tabell 5, Fig. 1). Mer detaljert informasjon om behandlingsforsøket er gitt i masteroppgaven til Marielle Kallekleiv (2018).

Tabell 5. Oversikt over doser av antibakterielle midler til behandling etter eksperimentell smitte med atypisk *A. salmonicida*.

Antibakterielt middel	Gruppe	Medisinfôr	Dose (mg/kg/dag)	Vanlig fôr	Mengde fôr totalt	Behandling (dag)
Florfenikol	FFC10	1,2 % av 0,83 g fôr	10	0,3 %	1,5 %	1-10
Florfenikol	FFC20	1 % av 2 g fôr	20	0,5 %	1,5 %	1-10
Oksolinsyre	OA	0,5 % av 5 g fôr	25	0,1 %	1,5 %	1,2,4,6,8,10
Flumekin	FLU	0,5 % av 5 g fôr	25	0,1 %	1,5 %	1,2,4,6,8,10



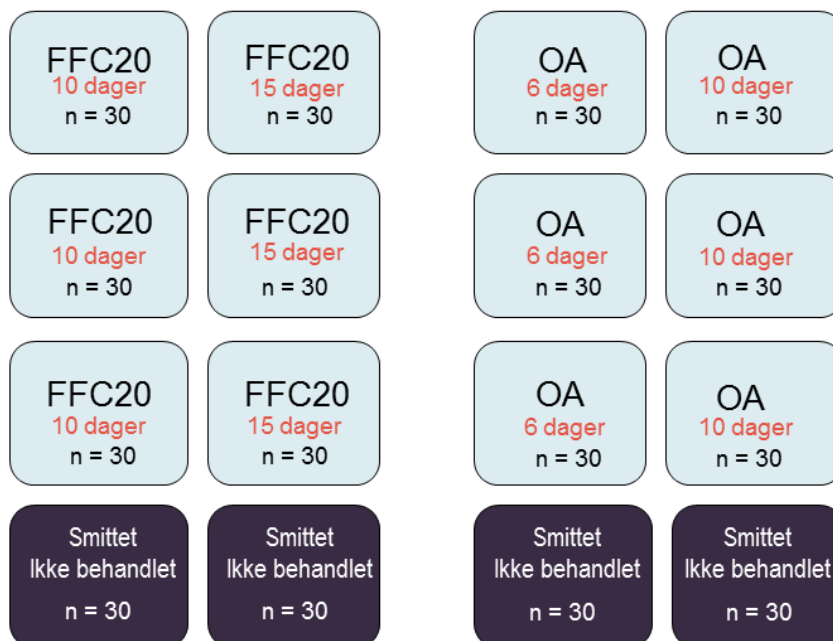
Figur 1. Oversikt over karoppsett og behandlingsgrupper etter eksperimentell smitte med atypisk *A. salmonicida*. Fire behandlingsgrupper med 3 parallelle kar pr gruppe (n=30 fisker per kar). Kontrollfiskene var smittet, men fikk ikke behandling. FFC10= florfenikol 10 mg/kg/dag, FFC20= florfenikol 20 mg/kg/dag, FLU= flumekin 25 mg/kg/dag, OA= oksolinsyre 25 mg/kg/dag.

5.16. Smitte med *Pasteurella* sp. og antibakteriell behandling

Totalt var det 480 fisker som ble fordelt på 16 kar, dvs 30 fisker pr kar. Alle fiskene ble smittet i.p. med 50 µl av 1×10^4 bakterier/ml. Kontrollfiskene var smittet, men ikke fikk behandling. Det var 4 grupper med behandling; florfenikol 20 mg/kg/dag i 10 dager, florfenikol 20 mg/kg/dag i 15 dager, oksolinsyre 25 mg/kg/dag i 6 dager og oksolinsyre 25 mg/kg/dag i 10 dager (Tabell 6, Fig. 2).

Tabell 6. Oversikt over doser av antibakterielle midler til behandling etter eksperimentell smitte med *Pasteurella* sp.

Antibakterielt middel	Gruppe	Medisinfôr	Dose (mg/kg/dag)	Vanlig fôr	Mengde fôr totalt	Behandling (dag)
Florfenikol	FFC20	1 % av 2 g fôr	20	0,5 %	1,5 %	1-10
Florfenikol	FFC20	1 % av 2 g fôr	20	0,5 %	1,5 %	1-15
Oksolinsyre	OA	0,5 % av 5 g fôr	25	0,1 %	1,5 %	1,2,4,6,8,10
Oksolinsyre	OA	0,5 % av 5 g fôr	25	0,1 %	1,5 %	1-10



Figur 2. Oversikt over karoppsett og behandlingsgrupper etter eksperimentell smitte med *Pasteurella* sp. Fire behandlingsgrupper med 3 parallelle kar pr gruppe (n=30 fisker per kar). Kontrollfiskene var smittet, men fikk ikke behandling. FFC20= florfenikol 20 mg/kg/dag hver dag i 10 dager og 15 dager, OA= oksolinsyre 25 mg/kg/dag i 6 (dag 1,2,3,4,6,8,10) og hver dag i 10 dager.

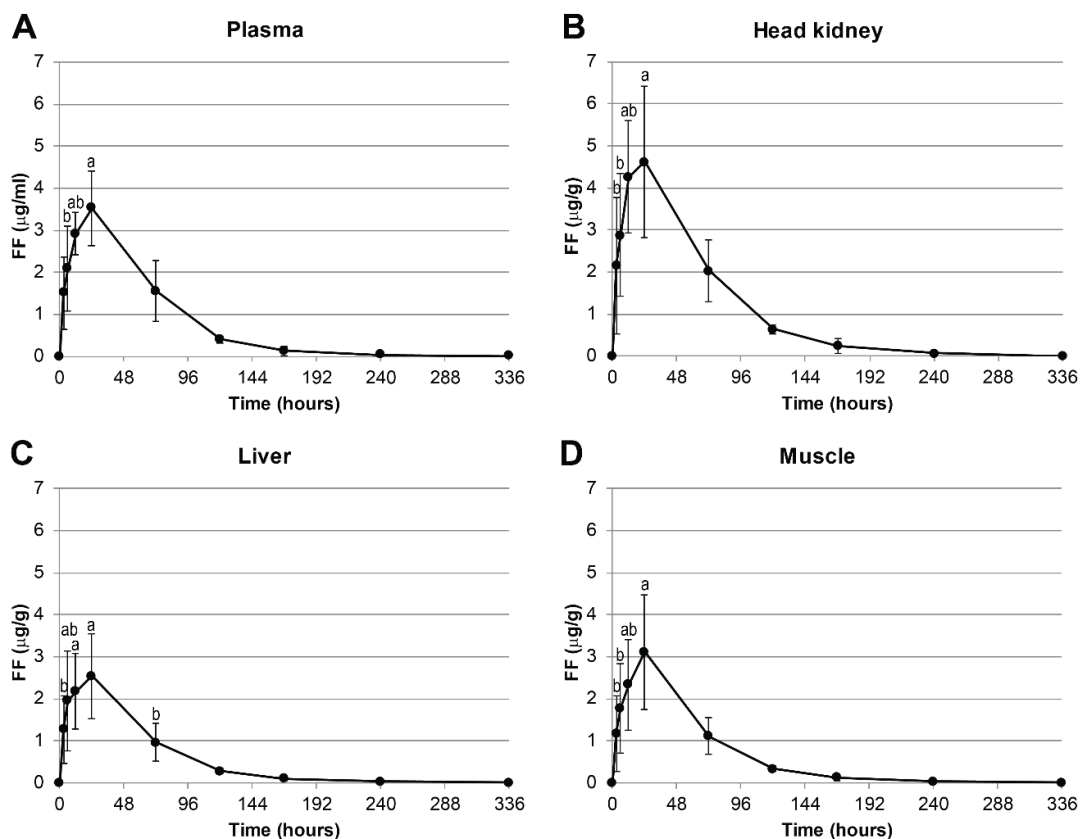
5.17. Statistiske analyser

For å undersøke om de farmakokinetiske dataene var statistisk signifikante, dvs. om det var en signifikant effekt av tid, ble det utført analyse av varians (ANOVA). Holm-Sidak metoden ble benyttet for parvis multippel sammenligning. Se Kverme et al. (manuscript under revisjon) for mer detaljer. For å undersøke om det var statistisk signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene, ble det utført Kaplan-Meier overlevelses analyse, Log rank test. Multippel parvis sammenligning ble utført med Holm-Sidak metoden.

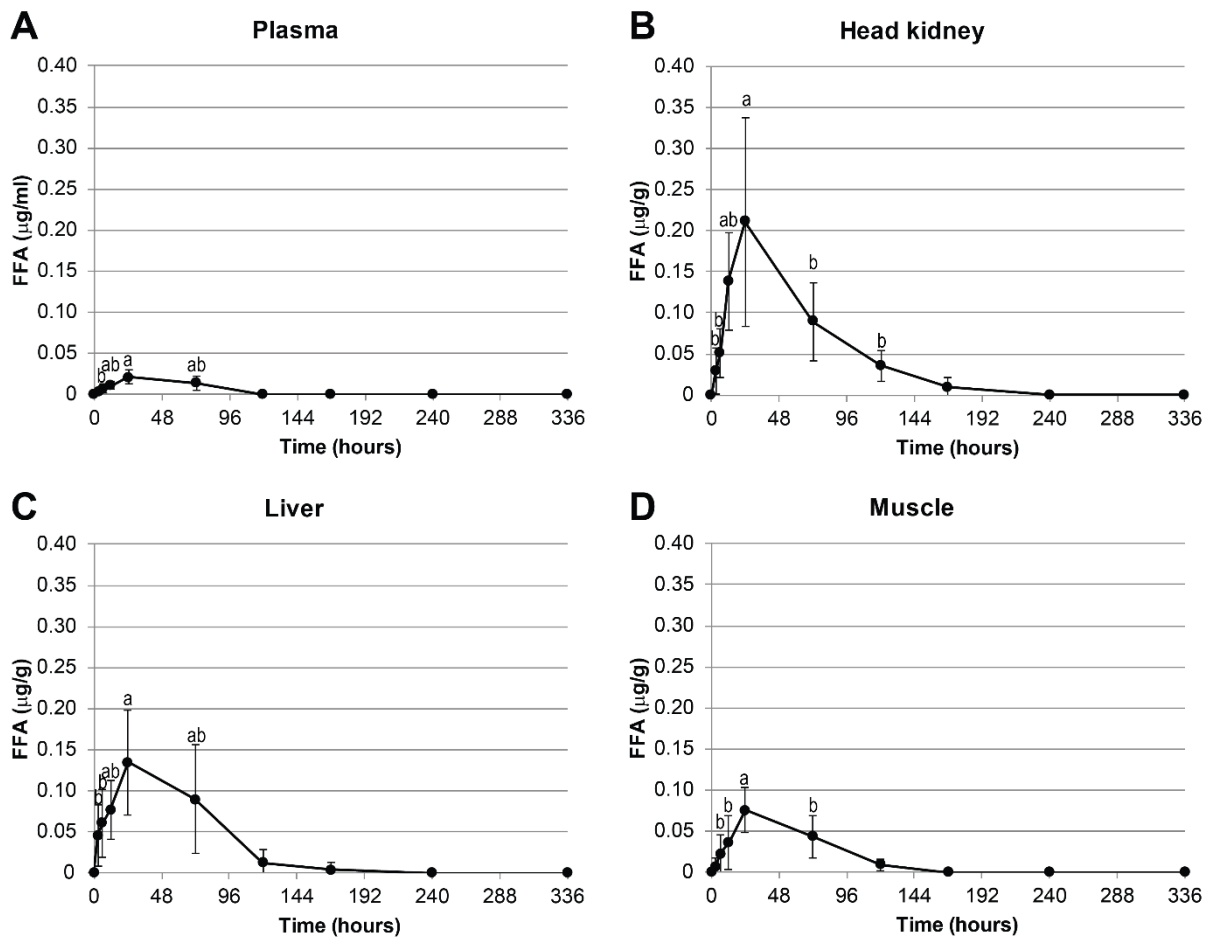
6. Resultater, diskusjon og konklusjon

6.1. Kinetikkanalyser etter administrering av florfenikol

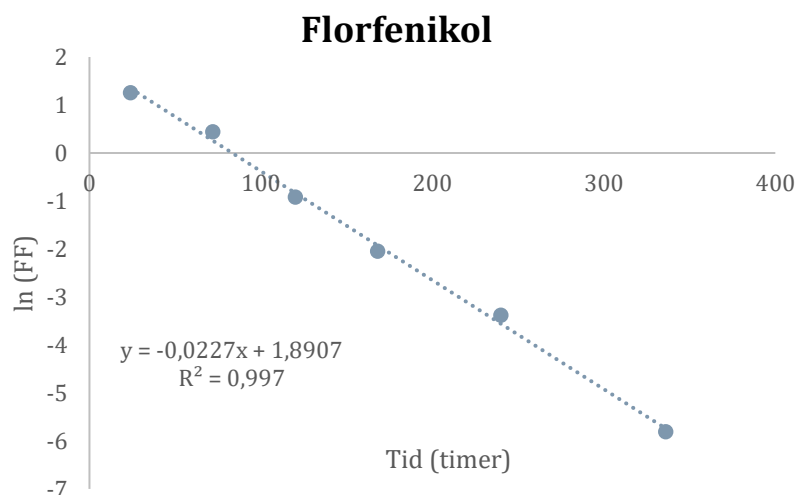
Gjennomsnittlige konsentrasjoner av florfenikol i plasma, hodenyre, lever og muskel etter oral administrering er vist i Fig. 3. Den høyeste konsentrasjonen av florfenikol ble detektert 24 timer etter administrering av fôret. Dette gjaldt både for plasma og alle vevene. Metabolitten florfenikol-amin ble detektert i plasma og alle vev (Fig. 4). Det var en signifikant effekt av tid for både florfenikol og florfenikol-amin ($p < 0.001$). Høyeste konsentrasjonen ble målt i hodenyre 24 timer etter oral administrering. Nivået ved 24 timer var signifikant høyere enn ved de andre tidspunktene, med unntak av 12 timer. Høyeste plasma konsentrasjon (C_{max}) ble beregnet til å være $3,55 \mu\text{g/ml}$, tiden det tok før den høyeste konsentrasjonen ble oppnådd (T_{max}) var 21,2 timer og elimineringshalveringstiden ($t_{1/2 \beta}$) ble beregnet til å være 30 timer (Fig. 5). Halveringstiden som ble målt i dette studiet indikerer at tilbakeholdelsestiden etter behandling med florfenikol kan bli satt kortere enn 500 døgngader. Kinetikkresultatene kan også benyttes til å beregne teoretisk dose til behandling. Mer detaljert informasjon finnes i masteroppgaven til Karen O. Kverme og i Kverme et al. (manuskript under revisjon).



Figur 3: Diagram for opptak og eliminering av florfenikol (FF) ved ulike tidspunkter etter administrering av medisinfôr (10 mg/kg). Konsentrasjoner av FF i plasma (A), hodenyre (B), lever (C) og muskel (D). Figuren er hentet fra Kverme et al. (manuskript under revisjon).



Figur 4: Diagram for opptak og eliminering av florfenikol-amin (FFA) ved ulike tidspunkter etter administrering av medisinfor (10 mg/kg). Konsentrasjoner av FFA i plasma (A), hodenyre (B), lever (C) og muskel (D). Figuren er hentet fra Kverme et al. (manuskript under revisjon).



Figur 5: Halveringstid for florfenikol (FF).

6.2. Kinetikkanalyser etter administrering av oksolinsyre og flumekin

Den høyeste plasmakonsentrasjonen (C_{max}) av oksolinsyre var 2,12 $\mu\text{g/ml}$ og tiden det tok for å oppnå høyeste plasmakonsentrasjonen (T_{max}) var 10,3 timer (Fig. 6).

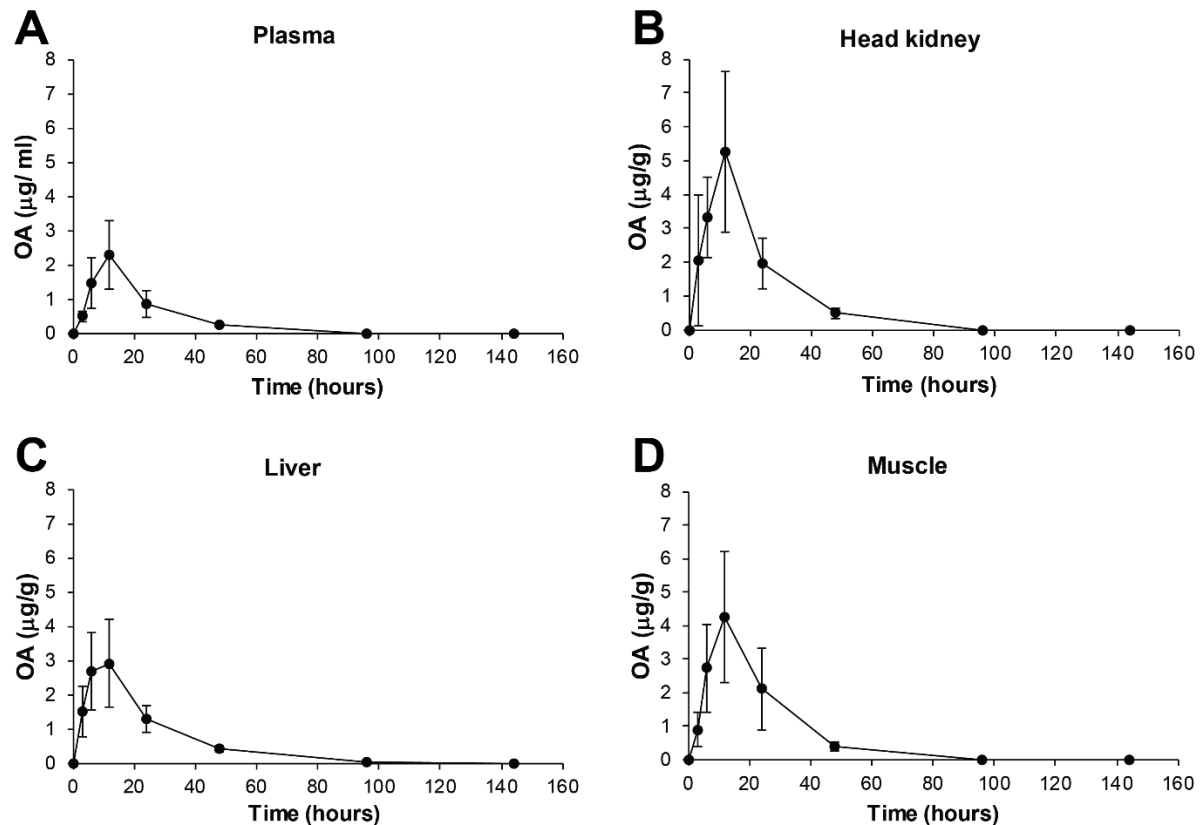
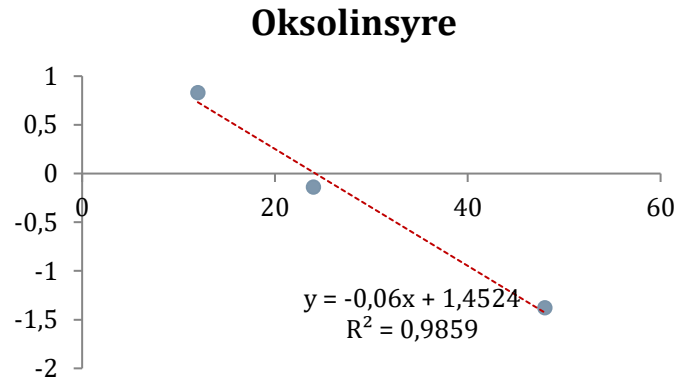


Fig. 6: Diagram for opptak og eliminering av oksolinsyre (OA) ved ulike tidspunkter etter administrering av medisinfôr (25 mg/kg). Konsentrasjoner av OA i plasma (A), hodenyre (B), lever (C) og muskel (D). Figuren er hentet fra Kverme et al. (manuskript in prep).

Plasmaverdiene ble benyttet for å beregne eliminasjons-halveringstider. For oksolinsyre var eliminasjons-halveringstiden 21 timer (Fig. 7). Halveringstiden som ble målt i dette studiet indikerer at tilbakeholdelsestiden etter behandling med oksolinsyre kan bli satt kortere enn 500 døgngader.



Figur 7: Halveringstid for oksolinsyre

For flumekin, var høyeste konsentrasjon i plasma, hodenyre, lever og muskel målt etter 6 timer (Fig. 8). Plasmakonsentrasjon (C_{max}) var 2,77 $\mu\text{g/ml}$, T_{max} var 7,7 timer og halveringstid var 22t. Halveringstiden som ble målt i dette studiet indikerer at tilbakeholdelsestiden etter behandling med flumekin kan bli satt kortere enn 500 døgninger.

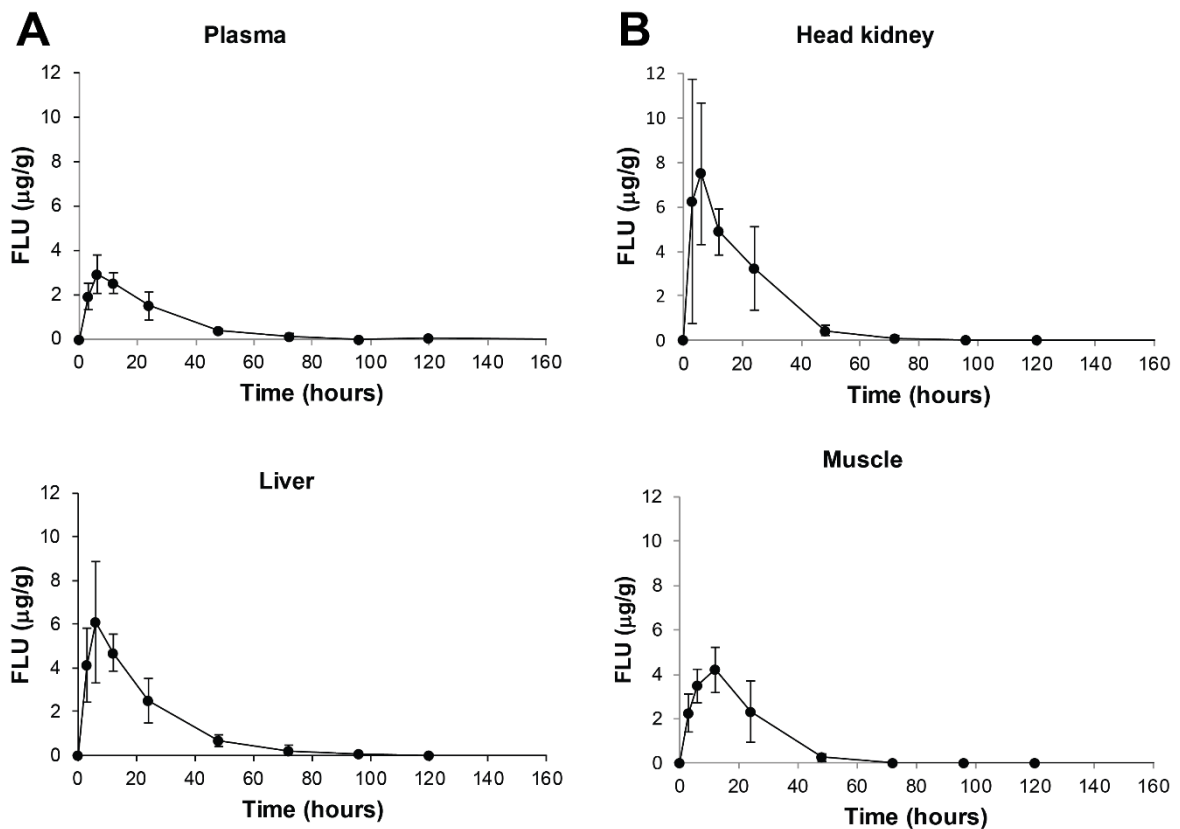
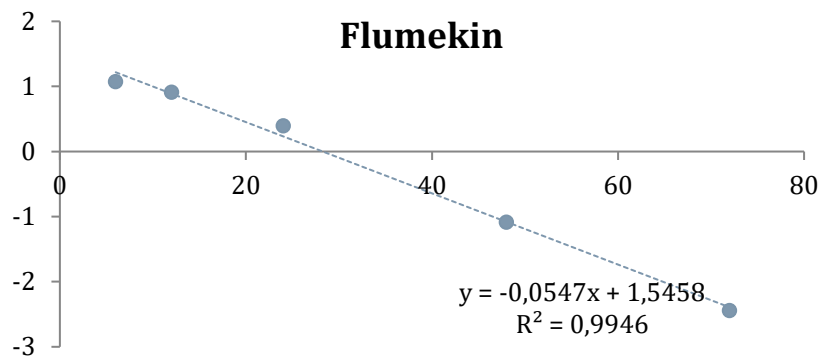


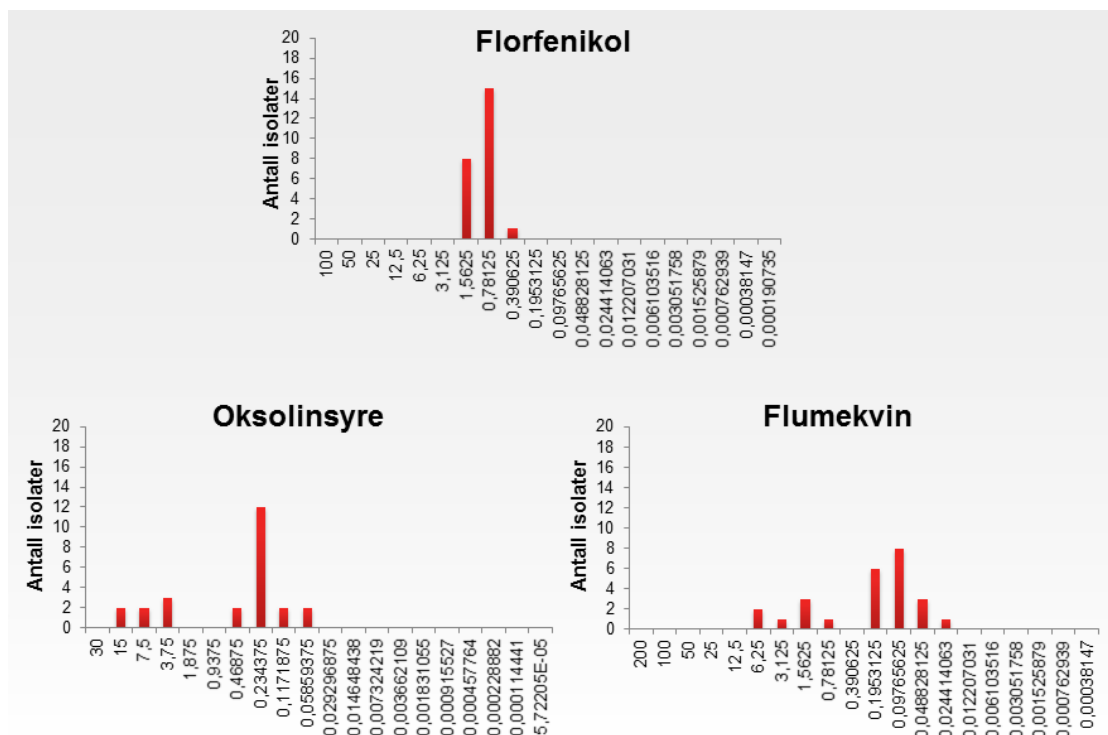
Fig. 8: Diagram for opptak og eliminering av flumekin (FLU) ved ulike tidspunkter etter administrering av medisinfor (25 mg/kg). Konsentrasjoner av FLU i plasma (A), hodenyre (B), lever (C) og muskel (D). Figuren er hentet fra Kverme et al. (manuskript in prep).



Figur 9: Halveringstid for flumekin

6.3. Sensitivitets-testing av 28 isolater av *A. sal* og *Pasteurella* sp.

Sensitiviteten av 28 isolater av *A. salmonicida*, samt *Pasteurella* sp. overfor 8 antibakterielle midler ble undersøkt. Alle var sensitive for florfenikol (MIC-verdier 0,39-1,56 µg/ml). For oksolinsyre og flumekin var det en bimodal fordeling der en gruppe av de atypiske *A. salmonicida* isolatene var sensitiv og en gruppe var lite sensitiv/ resistent over oksolinsyre. Oksolinsyre MIC-verdiene var i område (0,059-15 µg/ml), mens for flumekin var MIC-verdiene i område 0,024-6,25 µg/ml. Isolatet som ble benyttet til smitte var sensitiv for alle de antibakterielle midlene (Tabell 7).



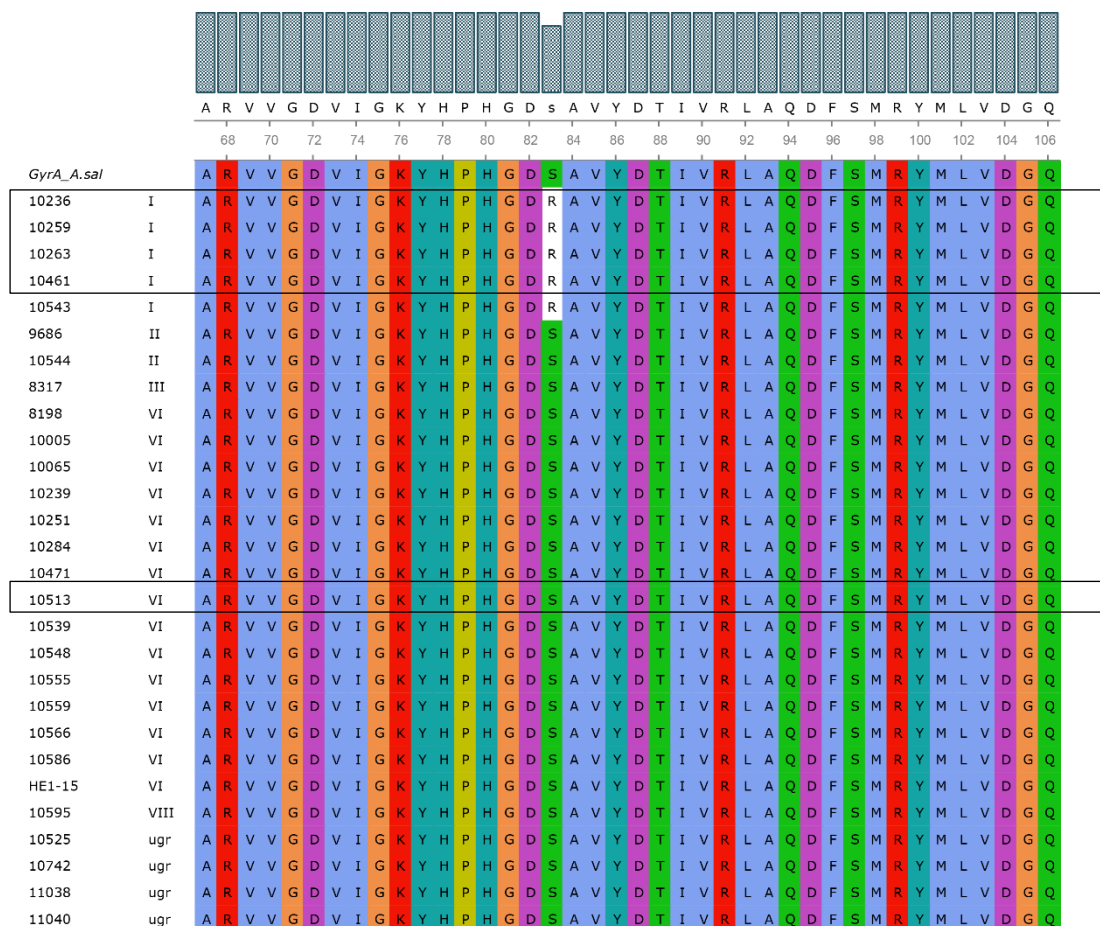
Figur 10. MIC-analyse. Sensitivitet av 28 isolater av *A. salmonicida* overfor florfenikol, oksolinsyre og flumekin.

Tabell 7. MIC-verdien av florfenikol, oksolinsyre og flumekin for isolatene benyttet i behandlingsforsøkene.

	Florfenikol (µg/ml)	Oksolinsyre (µg/ml)	Flumekin (µg/ml)
<i>Atypisk A. salmonicida</i>	0,78	0,23	0,05
<i>Pasteurella</i> sp.	0,2	0,47	0,1

6.4. Korrelasjon mellom kinolon-resistens og genmutasjon i *gyrA*.

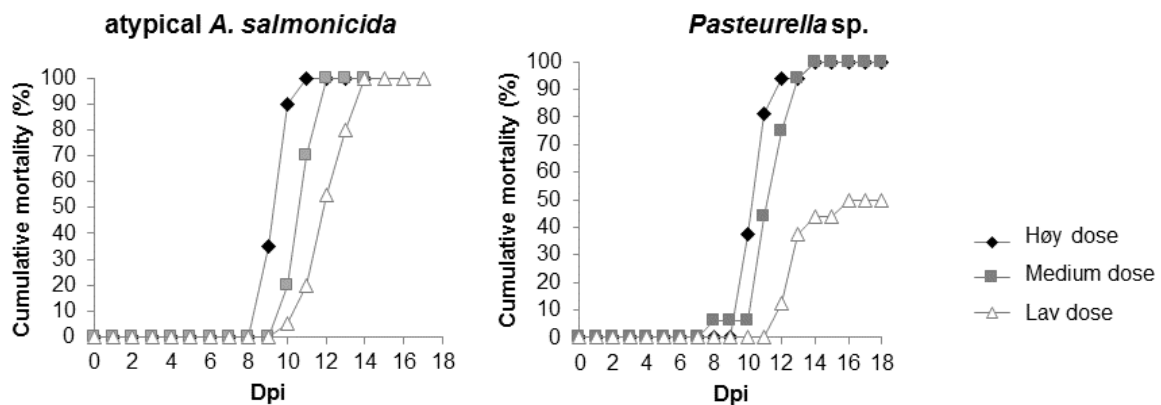
For å undersøke om det var korrelasjon mellom sensitivitet og mutasjoner i gener som man vet kan være involvert i kinolonresistens (Colquhoun et al. 2007), ble genene *gyrA* og *parC* sekvensert. Alle de resistente isolatene hadde den klassiske mutasjonen i *gyrA* i posisjon 83 (endring fra serin til arginin), med unntak av isolatet 10513 (Fig. 12). Denne endringen gjør at bakteriene ikke lenger påvirkes av kinolonene.



Figur 12. Aminosyresekvenser i det kinolon-resistens-bestemmende området av *gyrA* for 28 isolater av atypisk *A. salmonicida*. De isolatene som er lite sensitiv/resistent overfor kinolonene (oksolinsyre og flumekin) er rammet inn i svarte bokser. Referansesekvensen GyrA_A.sal er PMU06017.

6.5. Dosestest for bestemmelse av smittedose og behandlingsstart

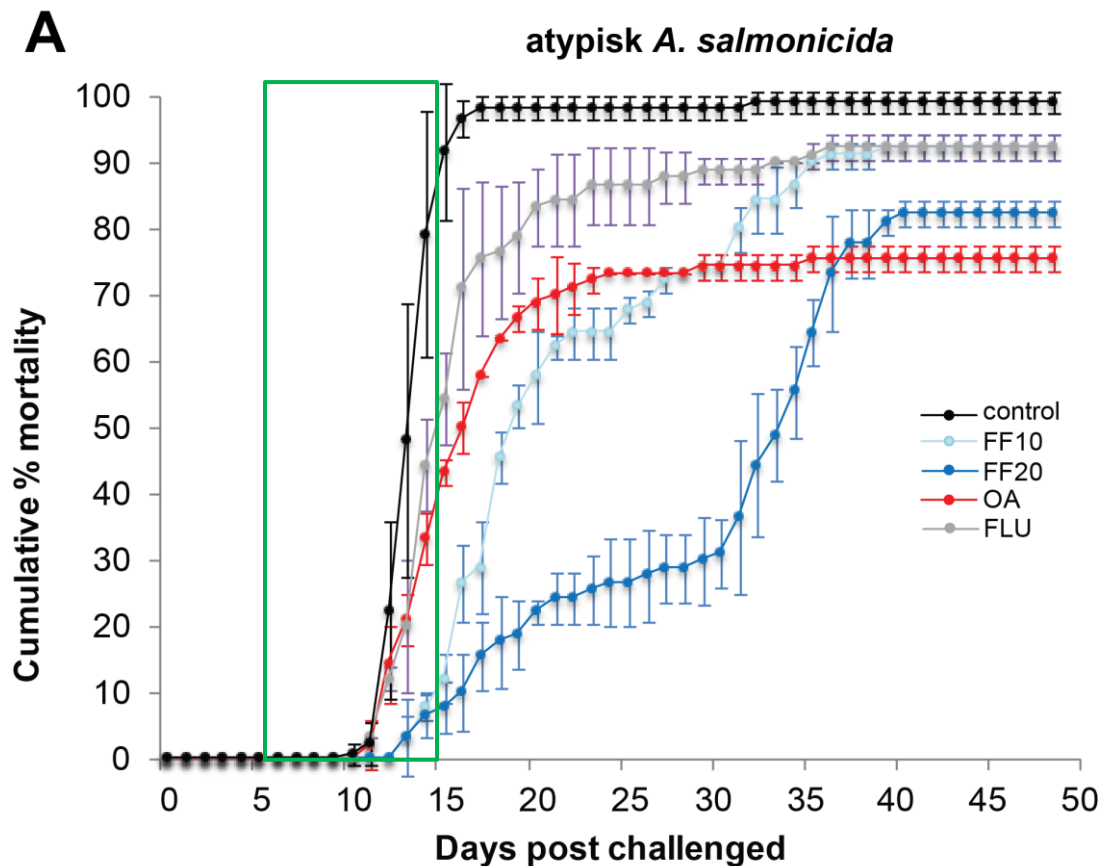
For å bestemme optimal dose og dag for behandlingsstart, ble doseforsøk utført. For atypisk *A. salmonicida*, startet dødeligheten dag 9 for den høyeste dosen og dag 10 for medium og lav dose. Alle dosene resulterte i 100% dødelighet (Fig. 13A). Det ble bestemt å bruke den laveste dosen (50 µl av 4×10^3 bakterier/ml per fisk) i behandlingsforsøket og at behandlingen skulle starte dag 5 etter smitte. I dose-testen for *Pasteurella* sp., startet dødeligheten hhv. dag 9,11 og 12 for høy, medium og lav dose, med unntak av 1 fisk i medium-dose-gruppen som døde dag 8 (Fig. 13B). Kumulativ dødelighet for de to høyeste dosene ble 100%, mens den laveste dosen ga 50% kumulativ dødelighet. Det ble bestemt at til behandlingsforsøket skulle det brukes den dose på 50 µl 1×10^4 bakt/ml (dvs. halvering av medium dosen) og at behandlingen skulle starte dag 5 etter smitte.



Figur 13. Dosestest. A) Rognkjeks smittet i.p. med tre ulike doser av atypisk *A. salmonicida*. B) Rognkjeks smittet i.p. (50 µl) med tre ulike doser av *Pasteurella* sp. Høy dose= 1×10^5 bakterier/ ml, Medium dose= 2×10^4 bakterier/ ml, gul dose= 4×10^3 bakterier/ ml.

6.6. Effekt av antibakteriell behandling etter smitte med atypisk *A. salmonicida*

Basert på dosetestene vist i Figur 13, ble det bestemt at behandlingen skulle starte dag 5 etter smitte. De antibakterielle midlene og dosene var basert på et tilsvarende forsøk med *V. anguillarum*, der alle antibakterielle midlene og dosene var effektive. Dødeligheten startet 10 etter smitte. Behandlingen varte i 10 dager (grønn boks i Figur 14).

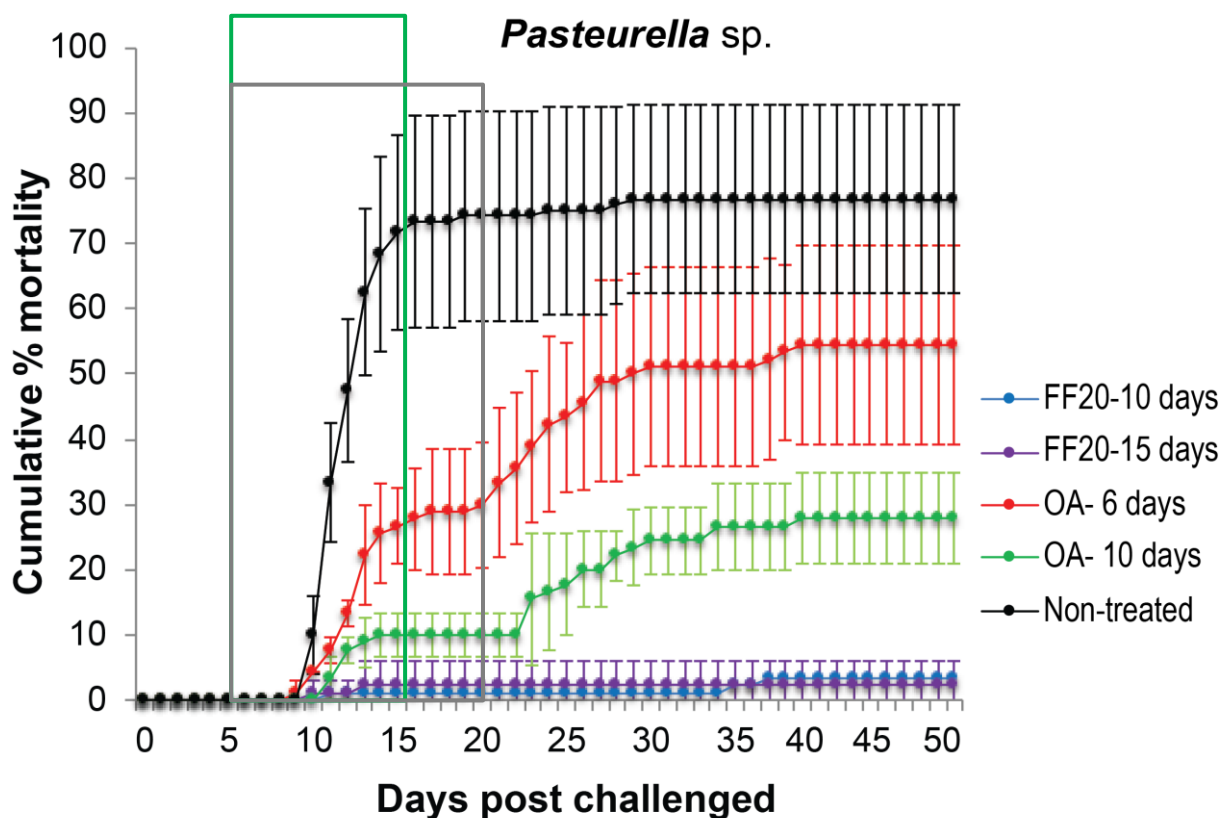


Figur 14. Kumulativ dødelighet etter smitte med atypisk *Aeromonas salmonicida*. Behandlingen med florfenikol (FF) var dag 1-10. Behandlingene med oksolinsyre (OA) og flumekin (FLU) var dag 1,2,4,6,8,10. Grafene viser gjennomsnittlig dødelighet av fisk i tre parallelle kar. De vertikale linjene viser standardavvik.

For å beregne om det var statistiske forskjeller mellom behandlingsgruppene ble det laget med Kaplan-Meier kurve (Haugland et al., manuskript). Det var signifikante forskjeller mellom overlevelseskurvene ($P = < 0,001$). Statistiske forskjeller mellom gruppene er oppsummert i Haugland et al (manuskript). Selv om ingen av behandlingene var effektive, viste behandling med FF20 (florfenikol 20 mg/kg/dag i 10 dager) mest lovende resultater, selv om dødeligheten tok seg opp etter behandlingen var ferdig. Bakterier ble isolert fra alle døende og døde fisker gjennom hele forsøket.

6.7. Effekt av antibakteriell behandling etter smitte med *Pasteurella* sp.

Basert på dosetestene vist i Figur 13, ble det bestemt at behandlingen skulle starte dag 5 etter smitte. Ettersom det er mistenkt at *Pasteurella* sp. muligens kan være fakultativt intracellulær, og kanskje være vanskelig å behandle slik som atypisk *A. salmonicida*, ble det besluttet å bruke høyeste dose av florfenikol FF20 (20 mg/kg/dag) og se om det var forskjell på 10 og 15 dagers-behandling. Det ble også undersøkt om det var forskjell på behandling med oksolinsyre 6 dager (dag 1,2,4,6,8 og 10) og 10 dager. Dødeligheten startet dag 10. Det store standardavviket på den ikke-behandlede gruppen skyldtes at i et av karene var det mye lavere dødelighet blant rognkjeksene enn i de tre andre kontroll-karene. (Fig. 15). Det var også store forskjeller i oksolinsyre-behandlingen i 6 dager. Som vist i Figur 15 er det stor forskjell i overlevelse mellom de som fikk oksolinsyre i 6 dager versus de som fikk oksolinsyre i 10 dager. Det var en statistisk signifikant forskjell mellom behandlingsgruppene ($P < 0,001$). Oppsummering av de statistiske analysene er gitt i Haugland et al. (manuskript).



Figur 15. Kumulativ dødelighet etter smitte med atypisk *Aeromonas salmonicida*. FF behandlingen var dag 1-10 eller dag 1-15. Behandlingene med oksolinsyre (OA) var 6 dager (dag 1,2,4,6,8,10) eller hver dag i 10 dager. Grafene viser gjennomsnittlig dødelighet av fisk i tre parallelle kar. De vertikale linjene er standardavvik. Grønn boks viser perioden fiskene fikk medisinfor (FF20-10 dager og begge OA gruppene). Grå boks viser behandlingsperioden hvor fiskene fikk florfenikol i 15 dager.

7. Hovedfunn

Samlet sett er florfenikol å foretrekke til behandling av rognkjeks med pasteurellose og selv om det ikke er effektivt nok mot atypisk furunkulose, er det det best tilgjengelige alternativet. I tidligere arbeid, har vi vist at florfenikol også var effektivt til behandling av rognkjeks med vibriose (Haugland et al., manuskript in prep).

- **Pasteurellose:** Til behandling av rognkjeks smittet med *Pasteurella* sp., undersøkte vi om det var forskjell i florfenikol (20 mg/kg/dag)-behandling hver dag i 10 dager vs. 15 dager. Begge behandlingene var effektive (liten dødelighet), men vi observerte tydelige forskjeller i adferd mellom disse to gruppene og vi anbefaler derfor 15 dagers behandling dersom *Pasteurella* påvises. Oksolinsyre er mindre effektivt enn florfenikol, men dersom dette brukes, er det viktig å behandle hver dag i 10 dager istedenfor 6 dager (dag 1, 2, 4, 6, 8, 10.). Kinetikk-analysene våre forklarer dette da oksolinsyre elimineres raskt fra vev, og føring annenhver dag vil derfor trolig ikke være tilstrekkelig for å opprettholde en høy nok konsentrasjon.
- **Atypisk furunkulose:** Ingen av de testede antibakterielle midlene hadde god effekt mot atypisk *A. salmonicida*. Det minst dårlige alternativet var florfenikol 20 mg/kg/dag hver dag i 10 dager. Det er mulig at en forlenget behandlingsperiode, fra 10 til 15 dager med florfenikol 20 mg/kg/dag, vil gi tilstrekkelig effekt, men dette må verifiseres eksperimentelt. Når det gjelder oksolinsyre-behandling (25 mg/kg/dag i 6 dager; dag 1,2,4,6,8 og 10) ga den lavest dødelighet ved slutten av forsøket, men heller ikke dette var effektivt nok. Det må også verifiseres eksperimentelt hvorvidt en behandling med oksolinsyre hver dag er mer effektivt og over lenger tid.
- **Vibriose:** I tidligere forsøk, undersøkte vi effekten av florfenikol 10 og 20 mg/kg/dag i 10 dager, oksolinsyre 25 mg/kg/dag og flumekin 25 mg/kg/dag i 6 dager (dag 1,2, 4, 6, 8 og 10) etter eksperimentell smitte med *V. anguillarum*. Alle behandlingene gav god effekt (Haugland et al., manuskript in prep).
- De farmakokinetiske halveringstidene som ble beregnet i dette studiet indikerer at tilbakeholdelsestiden kan være kortere enn 500 døgngrader for både florefenikol, oksolinsyre og flumekin.

Det bør arbeides videre med å optimalisere behandlingsregimet for rognkjeks med atypisk furunkulose for å finne medikament og dose som gir effektiv behandling. En kan merke seg at vi i kinetikkstudiene fant at oksolinsyre skilles raskt ut fra vev og plasma, og dette kan bety at en bør gi medisinfør hver dag og muligens over lenger tid. Man kan også vurdere å øke dosen. Disse forholdene er ikke testet eksperimentelt.

8. Takk

En stor takk til Paul Løvik for hjelp med smitte av fiskene og tusen takk til Felicia Dawn Couillard for veldig god hjelp med LC-MS/MS analysene.

9. Referanser

Colquhoun D, Aarflot L, Melvold CF (2007). *gyrA* and *parC* mutations and associated quinolone resistance in *Vibrio anguillarum* serotype O2b strains isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2597-2599.

Ellul RM, Walde C, Haugland GT, Wergeland H, Rønneseth A (2019). Pathogenicity of *Pasteurella* sp. in lump suckers (*Cyclopterus lumpus* L.). *Journal of fish diseases* 42(1):35-46

Giraud E, Blanc G, Bouju-Albert A, Weill FX, Donnay-Moreno C (2004). Mechanisms of quinolone resistance and clonal relationship among *Aeromonas salmonicida* strains isolated from reared fish with furunculosis. *Journal of Medical Microbiology* 53, 895-901.

Grave K & Helgesen KO (2018). Rapport 5-2018: Antibakterielle midler til oppdrettsfisk – rekvirering, forbruk og diagnoser 2013-2017. Veterinærinstituttet.

Gulla S, Lund V, Kristoffersen AB, Sørum H, Colquhoun DJ (2016). *vapA* (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. *Journal of fish diseases* 39(7): 867-877

Haugland GT, Rønneseth A, Wergeland HI (2018). Immunology and vaccinology of lumpfish and wrasse. In treasurer J (ed.) *Cleaner Fish Biology and Aquaculture Application*. Sheffield: 5M Publishing. pp 258-280

Kallekleiv M (2018). Antimikrobiell sensitivitetstesting av *Aeromonas salmonicida* isolater og behandling av rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) etter eksperimentell smitte med atypisk *A. salmonicida*. Masteroppgave, Universitetet i Bergen.

Kverme KO (2017). Antibakteriell behandling av rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) – bakteriedyrking, resistenstesting, farmakokinetikk og behandling. Masteroppgave, Universitetet i Bergen.

Nordstrand H, Sæbjørnsen H, Vaagnes Ø, Glosvik H, Colquhoun D (2017). Utfordrende å vaksinere rognkjeks mot atypisk *Aeromonas salmonicida*. *Norsk fiskeoppdrett* 11, 42-45.

Rønneseth A, Haugland GT, Colquhoun DJ, Brudal E, Wergeland HI (2017). Protection and antibody reactivity following vaccination of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 64, 383-391

Rønneseth A, Haugland GT, Colquhoun D, Wergeland HI (2014a). Rapport til FHF fra prosjektet Rensefiskhelse – Tapsårsaker og smitte modeller (Ap3).

Rønneseth A, Nilsen H, Haugland GT, Colquhoun D, Wergeland HI (2014b). Rapport til FHF fra prosjektet Rensefiskhelse – Utvikling av smitte modell med *Pasteurella*.

Scholz F, Glosvik H, Marcos-Lopez M (2018). Cleaner fish health. In treasurer J (ed.) Cleaner Fish Biology and Aquaculture Application. Sheffield: 5M Publishing. pp 221-250

Walde C, Gulla S, Hansen H, Bysveen M, Bornø G (2019). Helsesituasjonen hos rensesk. Fiskehelseporten 2018, Veterinærinstituttet, 119- 125.

10. Leveranser

Masteroppgaver tilknyttet prosjektet:

Karen Obrestad Kverme (2017). Antibakteriell behandling av rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) – bakteriedyrking, resistenstesting, farmakokinetikk og behandling

Marielle Kallekleiv (2018). Antimikrobiell sensitivitetstesting av *Aeromonas salmonicida* isolater og behandling av rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) etter eksperimentell smitte med atypisk *A. salmonicida*.

Kristina Larsen (skal levere i 2019). *Pasteurella* sp. og rognkjeks – innate immunresponser og antibakteriell behandling av rognkjeks etter eksperimentell smitte med *Pasteurella* sp..

Manuskript:

Kverme KO, Haugland GT, Hannisdal R, Kallekleiv M, Colquhoun DJ, Lunestad BT, Wergeland HI, Samuelsen OB. Pharmacokinetics of florfenicol in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) after a single oral administration. *Manuskript under revisjon.*

Kverme KO, Haugland GT, Hannisdal R, Kallekleiv M, Colquhoun DJ, Lunestad BT, Wergeland HI, Samuelsen OB. Absorption, tissue distribution and excretion of flumequine and oxolinic acid in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) after a single oral administration at a temperature of 12°C. *Manuskript in prep*

Haugland GT, Kverme KO, Larsen K, Kallekleiv M, Rønneseth A, Samuelsen OB, Wergeland HI. Antibacterial treatment of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) experimentally challenged with *Vibrio anguillarum*, atypical *Aeromonas salmonicida* and *Pasteurella* sp. *Manuskript in prep.*

Foredrag:

Haugland GT, Kverme KO, Kallekleiv M, Hannisdal R, Rønneseth A, Lunestad BT, Colquhoun, DJ, Samuelsen OB, Wergeland HI (2018). Antibiotika-resistens hos fiskepatogene bakterier, farmakokinetikk og antibakteriell behandling av rognkjeks. Havbrukskonferansen 2018, Oslo.

Haugland GT, Kverme KO, Larsen K, Kallekleiv M, Hannisdal R, Rønneseth A, Lunestad BT, Samuelsen OB, Wergeland HI (2019). Pharmacokinetic and effect of antibacterial treatments of lumpfish experimentally challenged with *V. anguillarum*, atypical *A. salmonicida* and *Pasteurella* sp. EAAP2019.

Poster:

Kallekleiv M, Colquhoun DJ, Rønneseth A, Wergeland HI, Samuelsen OB, Haugland GT (2019). Antimikrobiell sensitivitetstesting av *Aeromonas salmonicida* isolater fra rognkjeks. Frisk fisk 2019, Tromsø.