Miljø-DNA påvisning av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*

Matilde Holmeset

Master i fiskehelse – akvakultur

Institutt for biovitenskap

Universitetet i Bergen, Norge

Mai 2022

© Matilde Holmeset

2022

Miljø-DNA påvisning av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*

Universitetet i Bergen, 2022

Forord

Denne masteroppgaven ble utført som en del av FHF-prosjektet «Pasteurellose hos norsk laks» (prosjektnummer 901680). Arbeidet med oppgaven ble utført på Veterinærinstituttet i Bergen og Ås.

Først og fremst vil jeg gi en stor takk til hovedveilederen min, ved Veterinærinstituttet og UiB, Duncan Colquhoun, for et spennende prosjekt. Tusen takk for at du alltid har vært tilgjengelig med faglig og god rådgiving gjennom hele året. Jeg vil også takke veilederen min Sonal Patel for all hjelp og støtte under prosjektet. Jeg er svært takknemlig for tiden dere har lagt ned for å hjelpe meg, det har vært uvurderlig. Jeg må også gi en stor takk til medveilederne mine Bjørn Spilsberg og Snorre Gulla ved Veterinærinstituttet på Ås, og Anne-Berit Olsen ved Veterinærinstituttet i Bergen, for rettledning og gode tips underveis.

Videre vil jeg takke alle dere fantastiske ansatte på Veterinærinstituttet i Bergen. Deres kompetanse, raushet og gode humør har gjort tiden som masterstudent helt super. En ekstra takk til Kirsten Bottolfsen som har gjort det mulig for meg å gjennomføre alt av laboratoriearbeid.

Vil også takke de tre oppdrettsanleggene som har deltatt i studiet, og gitt tilgang til fisk og produksjonsdata.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter for fem fantastiske år fylt med mye sprell og moro. Og til dere tre jeg har delt lesesal med – *tusen takk* for at dere har holdt ut med meg, og for alle mer eller mindre relevante samtaler.

Sammendrag

Pasteurellose forårsaket av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) har de siste årene etablert seg som en bakteriesykdom som truer fiskevelferd og bærekraftig produksjon i den norske oppdrettsnæringen. Sykdomsbilde og alvorlighetsgrad kan variere mye fra utbrudd til utbrudd. Ofte kan bakterien forårsake en kronisk infeksjon, med lav prevalens som kan være vanskelig å diagnostisere. Det mistenkes derfor at det er flere anlegg med infiserte laksepopulasjoner enn de som er bekreftet infisert. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om miljø-DNA-prøver samlet under termisk avlusning er egnet til påvisning av sub-klinisk infeksjon med *P. atlantica* gv. *salmonicida* hos norsk laks. Samt undersøke om bakteriens DNA i vannprøvene degraderes under lagring.

Infisert fisk skiller sannsynligvis ut små mengder av bakterien til omgivelsene. På grunn av den store fortynningseffekten det er i åpent hav kan det være vanskelig å detektere bakterien i sjøvann samlet fra merd. Under termisk avlusning behandles store mengder fisk gjennom et begrenset volum med temperert vann, og eventuelle smittsomme mikroorganismer som skilles ut fra fisken vil kunne oppkonsentreres. Resultater fra dette studiet viser at *P. atlantica* gv. *salmonicida* skilles ut fra infisert laks, og oppkonsentreres i behandlingsvannet under termisk behandling. Studiet viser også at miljø-DNA-prøver samlet fra dette behandlingsvannet ser ut til å være egnet til påvisning av *P. atlantica* gv. *salmonicida* hos laksepopulasjoner med sub-klinisk og klinisk infeksjon. Bakteriens DNA ble også funnet på overflaten av gjeller og hud hos fisk i matfiskanlegg. Studien setter også spørsmålstegn rundt rengjøringen av utstyret som benyttes til avlusning. Degradering av *Pasteurella*-holdige miljø-DNA-prøver ble undersøkt ved ulike lagringsregimer. Resultatene viste at prøvene som oppbevares kjølig kan oppbevares i opp til syv dager frem til prosessering uten stor grad av degradering. Dersom miljø-DNA-prøvene oppbevares ved romtemperatur bør prøvene prosesseres innen tre dager.

Forkortelser

Forkortelser	Forklaring
ABS	Absolutt alkohol
ALO	Arginin dihydrolase, lysin dekarboksylase, ornitin dekarboksylase
bp	Basepar
CFU	Colony forming units/kolonidannende enheter
CMS	Cardiomyopatisyndrom
Ct	Cycle threshold
DNA	Deoksyribonukleinsyre
E	Effektivitet
FCS	Foeta calf serum
g	Gravitasjon
gv	Genomovar
HE	hematoxylin og eosin
HSMB	Hjerte og skjelettmuskelbetennelse
ILAV	Infectious lakseanemi virus
kg	Kilogram
L	Liter
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight
ml	Milliliter
NaCl	Natriumklorid
ng	Nanogram
OD	Optisk tetthet
OF	Oksidativ fermentativ
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PD	Pankreas sykdom
PO	Produksjonsområde
PoP	Proof of principle
PMCV	Piscine myocarditis virus
PRV	Piscine orthoreovirus
qPCR	kvantitativ PCR

R^2	Regresjonstall
RNA	Ribonukleinsyre
Rpm	Runder per minutt
rRNA	Ribosomalt RNA
Sp.	Species
SAV	Salmonid alphavirus
TSB	Tryptic soy broth
UV	Ultrafiolett
µl	Mikroliter

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon **1**

1.1 Norsk lakseoppdrett *1*

1.2 Bakteriesykdommer hos norsk oppdrettslaks *1*

1.3 Pasteurellose *2*
1.3.1 *Photobacterium damselae* 2
1.3.2 *Pasteurella skyensis* 3
1.3.3 Pasteurellose hos norsk oppdrettslaks 3
1.3.4 Pasteurellose hos rognkjeks 5
1.3.5 Dyrkning og fenotypisk karakteristikk 7

1.4 Miljø-DNA *7*

1.5 Termisk avlusning *8*

1.6 Bakgrunn og mål med studiet *10*

2. Materialer og metoder **12**

2.1 Termiske avlusinger *12*
2.1.1 Behandling med Optilicer på Lokalitet A 13
2.1.2 Behandling med Optilicer på lokalitet B 14
2.1.3 Behandling med Optilicer på lokalitet C 14

2.2 Prøveuttak *14*
2.2.1 Vann 14
2.2.2 Fisk 15

2.3 Naturlig forekomst av P. atlantica gv. salmonicida i PO 3 og 4 ..... *16*

2.4 Fenotypisk karakterisering av isolerte bakterier *17*
2.4.1 Kolonimorfologi 17
2.4.2 Oksidativ/Fermentativ-test (OF-test) 18
2.4.3 Oksidaseproduksjon 18
2.4.4 Gram farging 18

2.5 MALDI-TOF; Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight *19*

2.6 Optimalisering av vannfiltrering og lagring av vannprøver *19*
2.6.1 Dyrkning av bakterier til laboratorieforsøk 20

2.7 DNA-ekstraksjon *22*
2.7.1 DNA-ekstraksjon fra vev og bakteriekulturer 22
2.7.2 DNA-ekstraksjon fra nitrocellulose filtre 23
2.7.3 Isolering av DNA fra svaberprøver 23
2.7.4 Bestemmelse av templat DNA-kvalitet og mengde 23

2.8 Polymerase kjedereaksjon (PCR) *24*
2.8.1 Real time polymerase kjedereaksjon (PCR) 24
2.8.2 Regresjonskurve 26

2.9 16S ribosomalt RNA (rRNA) sekvensering *27*

2.10 Histologi og HE-farging *29*

2.11 Prevalens *30*

2.12 Beregning av Ct-verdi med ulike volum *30*

3 Resultater **31**

3.1 Real time PCR resultater *31*
Effektivitet 31
Spesifisitet 32

3.2 Lokalitet A *34*
Histologi 36
Termisk behandling - august 37
Termisk behandling - september 37
Termisk behandling – oktober 40
3.3 Lokalitet B *41*
3.4 Lokalitet C *44*
3.5 Validering av filtrering og lagring av miljø-DNA-prøver *46*
3.5.1 Pumpehastighet 46
3.5.2 Effekt av lagring over tid ved 4 °C og 22 °C på deteksjon 48
3.6 Naturlig forekomst av Pasteurella atlantica gv. salmonicida i PO 3 og 4 ..... *53*
4. Diskusjon **55**
4.1 Real time PCR *55*
4.2 Miljø-DNA *57*
5. Konklusjon og forslag til videre arbeid **64**
6. Referanser **65**
Vedlegg **70**

1. Introduksjon

1.1 Norsk lakseoppdrett

Siden starten av norsk fiskeoppdrett på 70-tallet har næringen vokst kraftig. I 2021 ble det produsert 1,3 millioner tonn atlantisk laks (*Salmo salar* L.*)* til en verdi av 81,4 milliarder kroner (Statistisk sentralbyrå, 2022). Dette gjør Norge til den ledende produsenten av laks på verdensbasis. Samtidig som det foregår vellykket storskala produksjon av laks står næringen ovenfor utfordringer, med hensyn til miljøet, økonomien og fiskevelferden. I 2021 døde det 54 millioner laks i sjøfasen, som utgjør 15,5 % av all sjøsatt laks (Sommerset et al., 2022). Det er store forskjeller i den geografiske fordelingen av dødeligheten, med høyest dødelighet i produksjonsområdene (PO) 2-4, med omtrent 20 % dødelighet (Sommerset et al., 2022). I PO 1, og området fra PO 6 og nordover er dødeligheten under 14 % (Sommerset et al., 2021). Infeksiøse sykdommer forårsaket av bakterier, virus og parasitter utgjør noen av de største problemene med hensyn på fiskevelferd. Noen sykdommer har vært lettere å motvirke enn andre, ved for eksempel vaksinering og/eller avl. I Veterinærinstituttets spørreundersøkelse hos fiskehelsepersonell og inspektører i Mattilsynet for 2021 ble blant annet infestasjon med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*, Krøyer, 1837), mekaniske skader relatert til avlusning, sårbakterier, og pasteurellose rangert blant de ti største helseproblemene hos laks i matfiskanlegg (Sommerset et al., 2022). Dette er utfordringer næringen må få under kontroll, for å kunne fortsette veksten i fremtiden.

1.2 Bakteriesykdommer hos norsk oppdrettslaks

Helt siden starten av norsk lakseoppdrett har bakteriesykdommer vært et problem. På 1980-tallet var bakteriesykdommen kaldtvannsvibriose, forårsaket av *Aliivibrio salmonicida*, tidligere kjent som *Vibrio salmonicida* (Egidius et al., 1987), det største sykdomsproblemet i norsk oppdrettsnæring (Hjeltnes et al., 1987). Noen år senere ble også bakterien *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, som forårsaker klassisk furunkulose (Munro & Hastings, 1993) årsak til høy dødelighet hos oppdrettslaks langs norskekysten. En annen alvorlig sykdom i norsk oppdrettsnæringen var forårsaket av bakterien *Vibrio anguillarum*, som gir klassisk vibriose (Haastein & Holt, 1972). Utviklingen av vaksiner, og gjennomføring av smittehygieniske tiltak gjorde at næringen etter hvert fikk kontroll på disse sykdommene, samt drastisk reduserte antibiotikaforbruket (Sommerset et al., 2005). I senere tid har bakterien *Yersinia ruckeri* vært et alvorlig problem både i ferskvanns og sjølokaliteter, men grunnet

vaksinering er bakterien under forholdsvis god kontroll (Sommerset et al., 2021), selv om det var noe økning fra 2020 til 2021 (Sommerset et al., 2022). Sårbakteriene *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* spp. forårsaker henholdsvis klassisk og atypisk vintersår. Sårbakteriene utgjør et alvorlig fiskevelferdsproblem og kan medføre store økonomiske tap. Selv om vaksinering av oppdrettslaksen ikke er påbudt vaksineres vanligvis atlantisk laks i Norge intraperitonealt (i.p.) mot bakteriesykdommene kaldtvannsvibriose, klassisk vibriose, furunkulose og klassisk vintersår. Det er også tilgjengelig immersjonsvaksiner mot *Yersinia ruckeri* (i tillegg til i.p vaksine). Det finnes derimot ikke tilgjengelige kommersielle vaksiner mot pasteurellose og tenacibaculose i norsk akvakultur. Til tross for fremskritt i kampen mot bakteriesykdommer utgjør sykdommene vintersår, yersiniose og pasteurellose et signifikant problem for lakseindustrien i dag.

1.3 Pasteurellose

1.3.1 *Photobacterium damselae*

Tradisjonelt er det infeksjon med *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (den opprinnelige stavelsen til det spesifikke epitetet, *damsela* har blitt korrigert av Trüper og De´ Clari (1997)) som er kjent som pasteurellose, også kalt pseudotuberkulose eller photobakteriose (Romalde, 2002). I 1963 ble det for første gang rapportert om pasteurellose hos fisk. Dette var i forbindelse med stor dødelighet av kvitabbor (*Morone americana)* og stripete havabbor (*Morone saxatilis)* i USA. Etter undersøkelse av morfologi, og en rekke biokjemiske egenskaper plasserte Snieszko et al. (1964) bakterien i slekten *Pasteurella.* Den samme bakterien ble videre undersøkt fire år senere, av Janssen og Surgalla (1968), som fant ut at bakterien skilte seg fra andre arter i *Pasteurella* slekten, og foreslo derfor et nytt artsnavn, *Pasteurella piscicida.* I 1995 ble det gjennomført en fylogenetisk analyse av 16S rRNA genet hos *Pasteurella piscicida*, som viste at den egentlig er nært beslektet til *Photobacterium damsela (Gauthier et al., 1995).* Det ble derfor foreslått en ny taksonomisk plassering, og et nytt navn, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida (Gauthier et al., 1995),* som klassifiseres under familien *Vibrionaceae.* Denne bakterien har et bredt vertsspekter blant varmtvannsarter, inkludert yellowtail (*Seriola quinqueradiata)* og ayu (*Plecoglosus altivelis)* i Japan *(Romalde, 2002).* I tillegg til gilthead seabream (*Sparus aurata)* og sea bass (*Morone saxatilis*) i Middelhavet, og hvit havabbor (*Morone americana)* i USA (Romalde, 2002). Pseudotuberkulose er ikke påvist hos laksefisk, og ikke hos noen arter i Norge, og må ikke blandes med pasteurellose forårsaket av *Pasteurella*

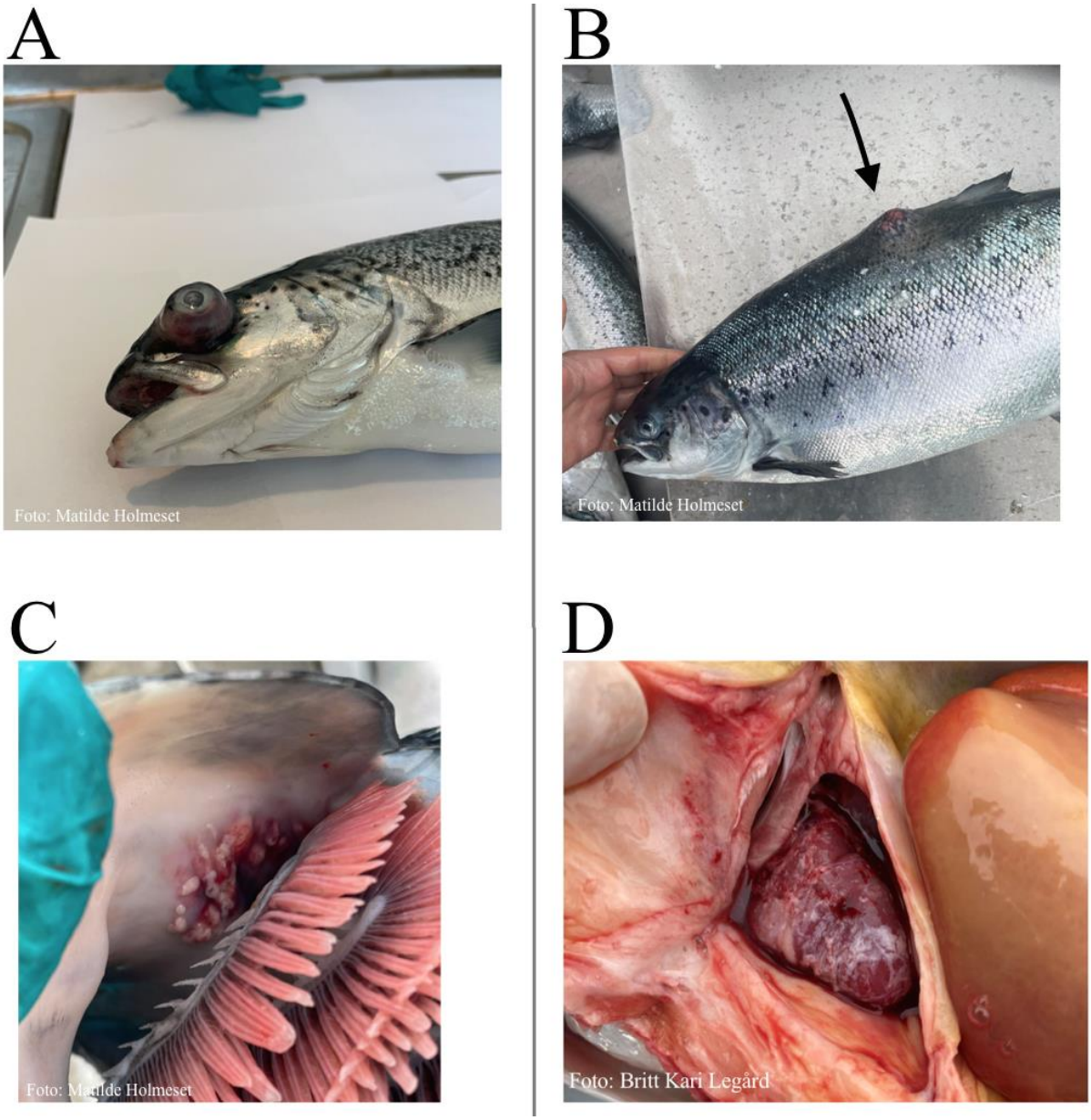
atlantica (ikke offisielt navngitt) eller *P. skyensis*, som begge er sanne medlemmer av Familien *Pasteurellaceae.*

1.3.2 *Pasteurella skyensis*

Fram til midten av 1990-tallet var det ikke rapportert om pasteurellose hos laksefisk i Skottland. I 1995, 1997 og 1998 ble det derimot rapportert om dødelighet av oppdrettet atlantisk laks (*Salmo salar*) assosiert med en *Pasteurella*-lignende mikroorganisme. Bakteriene var ubevegelige, gram negative, stavformet og måtte ha blod og salt i medium for å vokse (Birkbeck et al., 2002; Jones & Cox, 1999). Basert på biokjemiske og fysiologiske tester, i tillegg til sekvensering av 16S rRNA ble det vist at bakterien tilhører Familien *Pasteurellaceae* (Birkbeck et al., 2002). Denne bakteriearten er lite biokjemisk reaktiv, så Birbeck et al. (2002) brukte «small-volume heavy-inoculum method» for testing av katalaseaktivitet og nitratreduksjonsaktivitet. Nærmeste beslektet art basert på 16S rRNA genet var *Pasteurella phocoenarum* med 97,1 % likhet (Birkbeck et al., 2002) (senere bestemt som *Phocoenobacter uteri* (Foster et al., 2000)), men bakterien ble foreslått som ny art, og tildelt navnet *Pasteurella skyensis* (Birkbeck et al., 2002). *P. skyensis* var frem til 2020 utelukkende assosiert med sykdom i skotsk oppdrettslaks. I oktober samme år ble det bekreftet funn av *P. skyensis* hos oppdrettslaks i Norge (Veterinærinstituttet, 2020).

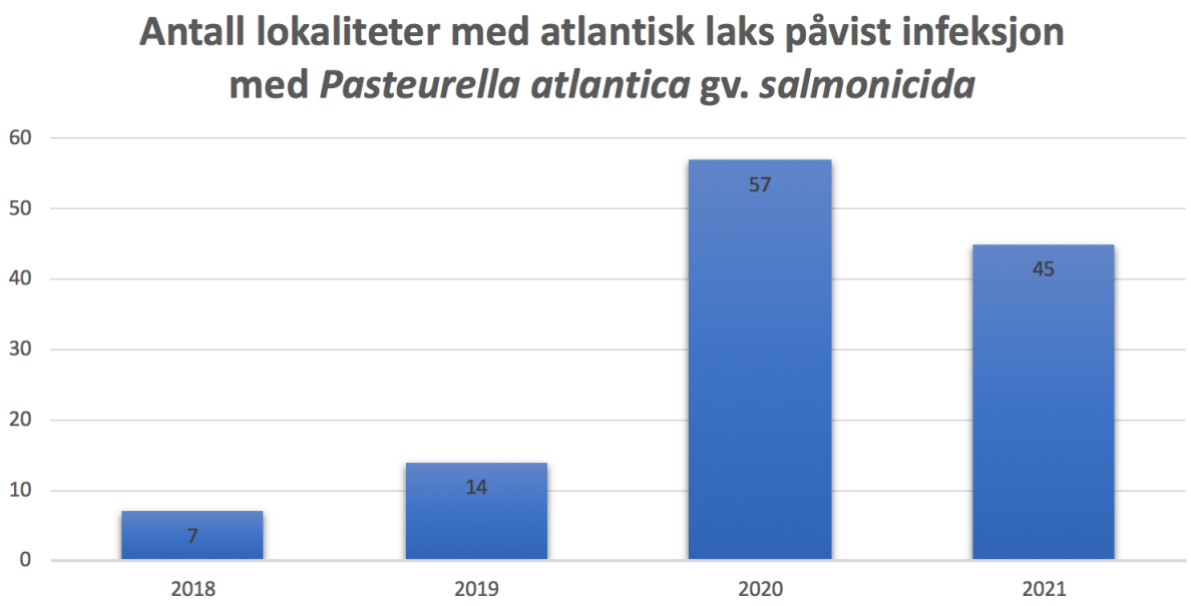
1.3.3 Pasteurellose hos norsk oppdrettslaks

I 1989 ble Pasteurellose hos atlantisk laks beskrevet for første gang i Norge (Valheim et al., 2000). Sykdommen ble først oppdaget i Nord-Norge og fikk navnet «Varracalbmi» som er samisk for «blodøye», heretter omtalt som pasteurellose. Som navnet tilsier er et karakteristisk sykdomsbilde uttalt infeksjon i øye og øyehule. Bakterien som forårsaker pasteurellose hos norsk laks er stavformet, gram negativ, ubevegelig og fakultativ anaerob (Valheim et al., 2000). Hos laks med pasteurellose er det stor variasjon i alvorlighetsgrad og klinikk. De vanligste kliniske tegnene er eksoftalmi (figur 1.1A), purulent peritonitt, og blakka væske i hjertehulen. I tillegg kan det forekommer abscesser (figur 1.1B), sår og fistler (figur 1.1 C) Histopatologisk er bakterien funnet i blodårer i gjellene, pseudobranken, hjertet, lever, milt og øye. I vevet rundt bakteriene kan det sees epikarditt, nekrose, granulom, blødning og trombose (Legård & Strøm, 2020).



Figur 1.1 Kliniske tegn på pasteurellose hos laks. Bilde A viser eksoftalmi, B viser byll (pil) i muskulatur, C viser fistler i og rundt pseudobranken, D viser epikarditt.

Etter 1989 har det vært sjeldne sykdomsutbrudd med pasteurellose og sykdommen forekom kun sporadisk, med ett utbrudd i 2000, ett i 2012 og syv i 2018 (statistikk fra Veterinærinstituttet). Etter 2018 har det vært en drastisk økning i tilfeller av *Pasteurella* sp. (ikke offisielt beskrevet *Pasteurella*) infeksjon hos norsk oppdrettslaks på Vestlandet (figur 1.2). I 2021 var det 45 lokaliteter med atlantisk laks i PO 1-5 som var diagnostisert med pasteurellose (Sommerset et al., 2022). Sykdommen ser ut til å etablere seg som en bakteriesykdom som truer fiskevelferden i laksenæringen.



Figur 1.2 Antall oppdrettslokaliteter med atlantisk laks med Pasteurella atlantica gv. salmonicida infeksjon for perioden 2018-2021 i Norge. Tallene er ikke direkte sammenlignbare, frem til 2019 er de basert på prøver sendt til Veterinærinstituttet, mens fra 2020 og 2021 er tallene basert på samkjørte tall fra noen private laboratorier i tillegg til Veterinærinstituttet.

Med formål om å studere diversitet hos ulike *Pasteurella*-varianter helgenomsekvenserte Veterinærinstituttet over 80 *Pasteurella*-isolater fra norsk og skotsk oppdrett (Gulla et al., 2020). Helgenomsekvenseringen identifiserte én gruppe nært beslektede isolater assosiert med sykdom hos norsk laks. Til denne gruppen ble det foreslått arbeidsnavnet *Pasteurella atlantica* genomovar *salmonicida* (Gulla et al., 2020). Sekvenseringsstudier har vist at *Pasteurella* bakterier tilknyttet «Varracalbmi» på 80-tallet tilhører samme genomovar som *P. atlantica* gv. *salmonicida* bakteriene som er tilknyttet pasteurellose tilfellene i senere tid (S. Gulla, pers. kom., 2022). Studien til Gulla et al., (2020) viste at det med to unntak (hvor rognkjeks ble holdt sammen med infisert laks), er en annen variant som assosieres med sykdom hos rognkjeks i Norge og Skottland. For denne gruppen er *Pasteurella atlantica* genomovar *cyclopteri* foreslått som arbeidsnavn (Gulla et al., 2020). Denne foreslåtte arbeidsnomenklaturen vil derfor benyttes videre i denne oppgaven.

1.3.4 Pasteurellose hos rognkjeks

De siste ti årene har kohabiterende rensefisk som biologisk avlusning økt drastisk i norsk lakseoppdrett. Dette innebærer å ha rensefisk i merdene som spiser lus av laksen. Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) og ulike arter av leppefisk (*Labridae*) blir brukt som rensefisk i Norge (Sommerset et al., 2021). Den økende etterspørselen etter rensefisk har ført til en ny industri,

med oppdrett av blant annet rognkjeks. I 2020 ble det solgt 35 millioner oppdrettet rognkjeks til verdi av 676 millioner kroner i Norge (Fiskeridirektoratet, 2021). Rognkjeksen har en raskere produksjonssyklus sammenlignet med leppefisk. I tillegg er rognkjeks aktive lusespisere ved kaldere temperaturer. Leppefisk spiser ikke lus av laksen ved temperaturer under 6 °C, mens rognkjeks er aktiv ned til 4 °C (Nytrø et al., 2014; Sayer & Reader, 1996). Bruken av rognkjeks som rensefisk har derimot ikke vært problemfri. Det er mange helseutfordringer som truer fiskevelferden til rognkjeks, med bakterielle og parasittiske sykdommer som de mest utbredte (Brooker et al., 2018). Pasteurellose forårsaket av *P. atlantica* gv. *cyclopteri* er en av de mest alvorlige bakteriesykdommene som truer fiskevelferden til rognkjeks.

Veterinærinstituttet har (retrospektivt) identifisert en *Pasteurella*-stamme som strekker seg tilbake til en villfanget rognkjeks prøvetatt i 1996 (D. Colquhoun, pers. kom., 2022). Første kjente tilfelle av pasteurellose hos oppdrettet rognkjeks i norsk akvakultur i nyere tid var i 2012 på en lokalitet i Sør-Norge (Johansen, 2013). Siden da har sykdommen blitt vanlig forekommende hos oppdrettet rognkjeks. Sykdommen kan forekomme hos rognkjeks i alle stadier, fra juvenile på 6-8 gram til stamfisk på 340 gram (Alarcón et al., 2016). Smitteveien til bakterien er usikker, i noen få tilfeller har Veterinærinstituttet påvist sykdom med *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* hos både laks og rognkjeks ved samme lokalitet (Sommerset et al., 2021). Siden pasteurellose er relativt vanlig hos rognkjeks kan rognkjeks i laksemerder potensielt smitte laksen, og motsatt. Sandlund et al. gjennomførte i 2021 et smitteforsøk for å studere mottageligheten atlantisk laks har til *Pasteurella* spp. infeksjon, og mulighet for overføring av pasteurellose mellom rognkjeks og atlantisk laks. Laksen og rognkjeksen ble bad- og kohabitantsmittet med et isolat isolert fra laks, antatt å være *P. atlantica* gv. *salmonicida* og et isolat isolert fra rognkjeks, antatt å være *P. atlantica* gv. *cyclopteri.* Resultatene viste at rognkjeksen utviklet pasteurellose etter smitte med begge bakterieisolatene, men med et raskere sykdomsforløp med *P. atlantica* gv. *salmonicida* enn med *P. atlantica* gv. *cyclopteri* (Sandlund et al., 2021). Laksen viste derimot ingen tegn til sykdom uansett smittevei eller bakterieisolat. Det er heller ikke kjente tilfeller av laks i matfiskanlegg som er infisert med *P. atlantica* gv. *cyclopteri*, noe som kan indikere liten eller ingen mottagelighet for denne bakterievarianten.

1.3.5 Dyrkning og fenotypisk karakteristikk

P. atlantica er en saktevoksende bakterie, som krever blod og salt for å vokse. Etter 48 timer inkubering på 22 °C på blodagar med 2 % NaCl synes ugjennomsiktige små og grå kolonier, ved lengre inkubering vil en kunne observere økt alfa-hemolyse (Figur 1.3).

Figur 1.3 Vekst av Pasteurella atlantica gv. salmonicida på blodagar med 2 % NaCl etter 2, 4 og 6 dager (fra venstre) ved 22 ℃. Foto: Matilde Holmeset.

Bakteriene er svakt oksidase positiv, produserer ikke indol og katalase, og er lite reaktiv under ALO testing (degradering av aminosyrene Arginin, Lysin og Ornitin). *P. atlantica* er fenotypisk lignende, men mindre biokjemisk reaktiv enn *P. skyensis* hos atlantisk laks i Skottland (Alarcón et al., 2016). Bakteriene er gram-negative, ikke-bevegelige kokker, som produserer syre fra glukose aerobt og anaerobt (Alarcón et al., 2016). Nyere resultater indikerer at *P. atlantica* gv. *salmonicida* vokser under anaerobe forholde, mens *P. atlantica* gv. *cyclopteri* ikke vokser under anaerobe forhold (H. Nilsen, pers. kom., 2022). Bakterien vokser i det flytende mediet Tryptic Soy Broth (TSB), tilsatt 10 % foetal calf serum (FCS) og 1,5 % NaCl, med maksimal konsentrasjon på $1{,}6 \times 10^9$ bakterier/ml, nådd 20 timer etter postinokulering ved 20 °C (Ellul et al., 2019).

1.4 Miljø-DNA

Miljø-DNA er DNA som kan ekstraheres fra en miljøprøve, som vann, jord eller luft uten å isolere målorganismen først (Taberlet et al., 2012). Miljø-DNA kan bestå av en kompleks blanding av DNA fra mange forskjellige organismer, og kan inneholde både intracellulært og ekstracellulært DNA. Det intracellulære DNAet kan stamme fra levende og døde intakte celler fra for eksempel hud, tarm og feces, eller flercellede organismer som er tilstede i prøven som undersøkes. Ekstracellulært DNA kan komme fra naturlig celledød og påfølgende destruksjon av cellestrukturer som destrueres gjennom fysiske, kjemiske eller biologiske prosesser. For

eksempel kan ekstracellulært DNA kuttes enzymatisk til mindre fragmenter av nukleaser i miljøet. I løpet av de siste årene har det vært store fremskritt i utviklingen av metoder for å påvise lave konsentrasjoner av patogener i vann ved å studere miljø-DNA. Det har blitt vist i forskningsstudier for blant annet fiskeektoparasitten *Gyrodactylus salaris* (Rusch et al., 2018), for oomyceten *Aphanomyces astaci* (D. A. Strand et al., 2019), bakterien *Yersinia ruckeri* (D. Strand et al., 2021), og virusene SAV (Salmonid alphavirus*)* (Bernhardt et al., 2021) og ILAV (Infeksiøs lakseanemi virus) (Weli et al., 2021), at vannfiltreringsteknikker har potensial for påvisning av patogener i vannprøver. Ved å overvåke miljøet til akvatiske organismer kan man hindre spredning av infeksiøse sykdommer på en dyrevennlig måte, hvor en unngår å avlive verten. Det kan også muliggjøre påvisninger av sub-kliniske infeksjoner og/eller infeksjoner som forekommer med lav prevalens. I tillegg vil næringen spare tid og ressurser på vannprøver fra fiskens omgivelser, fremfor omfattende prøveuttak av fiskens vev.

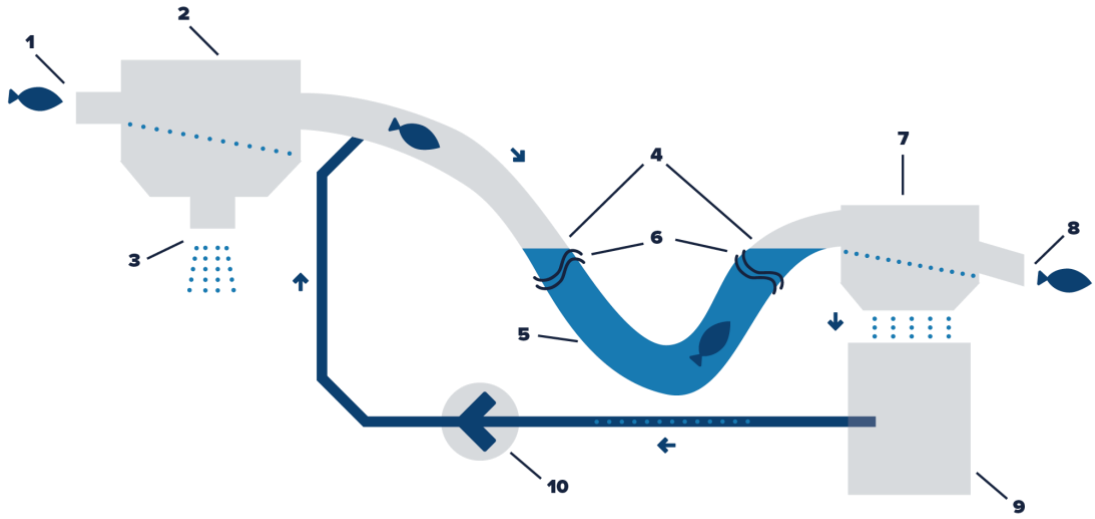
Det kan også være utfordringer knyttet til miljø-DNA som påvisningsmetode. Miljø-DNA er en kompleks blanding av DNA fra ulike organismer, og kan være nedbrutt, og i lave konsentrasjoner. Det kan derfor være vanskeligere å analysere miljø-DNA-prøver sammenlignet med DNA fra ferskt vev fra enkeltindivider. Flere studier og forskere har spekulert om abiotiske faktorer som temperatur, pH, konduktivitet og mikrobiell sammensetning i prøven kan påvirke degraderingen av miljø-DNA (Barnes et al., 2014). Høye temperaturer har for eksempel en direkte påvirkning ved å øke DNA nedbrytningen ved å denaturere DNA-molekyler (Barnes et al., 2014). Det har også en indirekte påvirkning på miljø-DNA ved å øke den enzymatiske kinetikken og den mikrobielle metabolismen (Barnes et al., 2014). Tsuji et al. (2017) viste at degraderingen av miljø-DNA akselererte med økende temperatur, men at bakteriell abundans ikke hadde signifikant effekt på nedbrytningen av miljø-DNA. Selv om det finnes ulemper med miljø-DNA-metoden er det en lovende metode for fremtidig deteksjon og overvåkning.

1.5 Termisk avlusning

Lakselus er en stor utfordring for lakseoppdrett (Costello, 2006), og kontroll av denne parasitten utgjør en stor økonomisk kostnad for næringen (Abolofia et al., 2017; Iversen et al., 2017). Tradisjonelt har lakselus blitt behandlet med kjemoterapeutika, hvorav organofosfater, pyretroider, hydrogenperoksid og avermektiner har vært de mest brukte stoffene (Overton et al., 2019). I tillegg benyttes det biologisk kontroll i form av rensefisk, og andre forebyggende

tiltak som laser, luseskjørt og lukkede merder i økende grad. Ensidig forbruk av legemidlene har resultert i utviklingen av lakselus med nedsatt følsomhet, og dermed redusert effekt av de medikamentelle behandlingene (Myhre Jensen et al., 2020). Dette har ført til at medikamentfrie metoder har blitt de foretrukne behandlingsmetodene i norsk akvakultur de seneste årene.

I norsk akvakultur benyttes det to kommersielle systemer for termisk avlusning, og tre ulike systemer for mekanisk avlusning. Det har også vært en økning i ferskvannsbadebehandlinger (Sommerset et al., 2021) i tillegg til at det nylig har blitt testet ut en ikke-medikamentell kombinasjonsbehandling som involverer termisk avlusning etterfulgt av spyling (Salvesen et al., 2021). Mekaniske avlusninger involverer spyling, børsting, eller negativt trykk og turbulens kombinert med spyling. Termisk avlusning innebærer at laksen og lakselusen eksponeres for oppvarmet sjøvann i en kort periode, vanligvis 29-34 °C i omtrent 30 sekunder. Det tempererte vannet fører til at lusen som sitter på fisken inaktiveres og faller av. I dag er det de kommersielle metodene kalt Thermolicer og Optilicer som kategoriseres som termiske behandlinger. I en Thermolicer er det et gjennomstrømningsprinsipp hvor laksen først pumpes opp av merden, sjøvann avsiles og laksen blir ført gjennom et rør med varmtvann og sjøvann avsiles igjen før fisken føres tilbake til merden ved hjelp av en renne (figur 1.4). I en Optilicer blir fisken pumpet opp av merden, sjøvann avsiles, og fisken føres gjennom et åpent bad med temperert vann ved hjelp av skovlehjul, før avsiling og tilbakeføring til sjø. Holdetiden i det tempererte vannet er vanligvis mellom 25 og 30 sekunder. Effekten er god på bevegelige lakselus og er beregnet til henholdsvis 98-100 % for Optilicer og 75-100 % for Thermolicer (Grøntvedt et al., 2015; Roth, 2016).



Figur 1.4 Illustrasjon av Thermolicer. 1: Fisken blir pumpet inn i systemet. 2: Silkasse som siler av sjøvannet. 3: Sjøvannet filtreres og slippes ut. 4: Fisken eksponeres for temperert vann. 5: Behandlingssøyle med oppvarmet vann (28-34 grader). 6: Vannoverflate i behandlingssøylen. 7: Vannavskiller for behandlingsvannet. 8: Fisken kommer ut av systemet. 9: Oppvarmet vann blir sirkulert tilbake til vanntanken for rensing, lufting og gjenoppvarming. 10: Behandlingsvannet blir pumpet tilbake til behandlingssøylen. Figuren er hentet fra produsenten sin nettside (SqcaleAQ.no)

Medikamentfrie avlusninger kan til tross for god effekt, medføre redusert fiskevelferd i form av stress og en rekke skader. I forkant av en avlusingsoperasjon må fisken håndteres i form av trenging og pumping før den behandles. SINTEF utførte i 2018 et prosjekt hvor de studerte fiskevelferd i forkant og etterkant av behandling med Hydrolicer (fisken utsettes for et undertrykk og turbulens). Fiskens stressnivå ble undersøkt ved å måle nivåene av kortisol, laktat, pH, natrium og klorid i blod, samt pH i hvit muskel. Fra dette prosjektet kommer det frem at fisken var betydelig stresset i forbindelse med trenging i merd/kast før selve avlusningen startet (Erikson et al., 2018). Utover dette ble det i hovedsak ikke målt ytterligere endringer i stressnivå videre i behandlingen. Stress-belastning fisken utsettes for kan forårsake skader, nedsatt immunitet og død (Bleie & Skrudland, 2014). I tillegg til stress kan fisken få skader i forbindelse med den mekaniske delen av behandlingen, ved pumping og trenging. Skader som fisken kan pådra seg er blant annet finneskader, snuteskade, øyeskader, skjelltap, hudblødninger og sår (Grøntvedt et al., 2015; Roth, 2016).

1.6 Bakgrunn og mål med studiet

Forekomsten av pasteurellose hos atlantisk laks i Norge er økende, og til tross for begrenset geografisk spredning må dette betraktes som en truende sykdom. Sykdomsbildet til populasjoner med pasteurellose kan variere fra alvorlige infeksjoner, til tilsynelatende frisk fisk

med sub-kliniske infeksjoner. Det er behov for forskning på denne bakteriesykdommen slik at næringen kan iverksette tiltak som kan hindre kliniske utbrudd, og videre spredning av sykdommen. En effektiv og skånsom metode som miljø-DNA for tidlig påvisning av pasteurellose hos populasjoner av laks vil gjøre det enklere å kartlegge utbredelsen av sykdommen i Norge. Samtidig som den vil gjøre oppdretterne i stand til å iverksette smitteverntiltak tidlig i infeksjonsløpet. Målene for denne oppgaven var derfor satt til:

- Undersøke om miljø-DNA-prøver av sjøvann samlet under termiske avlusninger er egnet til identifikasjon av sub-kliniske og alvorlige infeksjoner med *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida*
- Undersøke om svaber av hud og/eller gjeller er egnet for påvisning av *P. atlantica* gv. *salmonicida*
- Undersøke om *P. atlantica* gv. *salmonicida* forekommer som en naturlig del av bakgrunnsfloraen i overflatesjøvann i PO 3 og 4
- Teste påvirkning av filtrering og ulike lagringsregimer på deteksjon av *P. atlantica* gv. *salmonicida* i miljø-DNA prøver.

2. Materialer og metoder

2.1 Termiske avlusinger

I dette studiet ble det tatt prøver under fem termiske avlusninger, fordelt på tre ulike lokaliteter i kommersiell produksjon av atlantisk laks. Det ble benyttet Optilicer ved behandlingene. Grunnet anonymisering av lokalitetene blir de kalt lokalitet A, B og C. Lokalitetene befinner seg innenfor markert område i figur 2.1. Eksakt plassering blir ikke oppgitt. Lokalitet A behandlet mot lakselus i august, september og oktober 2021. Lokalitet B behandlet atlantisk laks i september 2021, og behandlingen som ble fulgt på lokalitet C foregikk i midten av oktober 2021. Fra lokalitet A ble det tatt vannprøver, vevsprøver til histologi og analyse med real time PCR, utstryk fra nyre på blodagar med 2 % NaCl, og svaberprøver fra hud og gjeller. Fra lokalitet B og C ble det tatt vannprøver. I etterkant av prøveuttak ble de respektive anleggene forespurt om å dele informasjon knyttet til dødelighet, abiotiske faktorer, diagnoser og eventuell annen viktig informasjon.

Figur 2.1 Kart som viser område (sirkel) hvor de tre lokaliteten (A, B og C) som ble prøvetatt er lokalisert innenfor.

2.1.1 Behandling med Optilicer på Lokalitet A

Fra lokalitet A ble det analysert prøver fra tre avlusninger på høsten i 2021. Fra første behandling i august 2021 ble vannprøver tatt av ansatte på anlegget, og sendt til filtrering og videre analyse ved Veterinærinstituttet på Ås. På andre behandling, i september 2021, ble det tatt vannprøver i tillegg til vevsprøver fra fisken til videre diagnostiske undersøkelser. Ved den tredje avlusningen ble det tatt vannprøver, vevsprøver av fisken i tillegg til svaberprøver fra hud og gjeller.

2.1.2 Behandling med Optilicer på lokalitet B

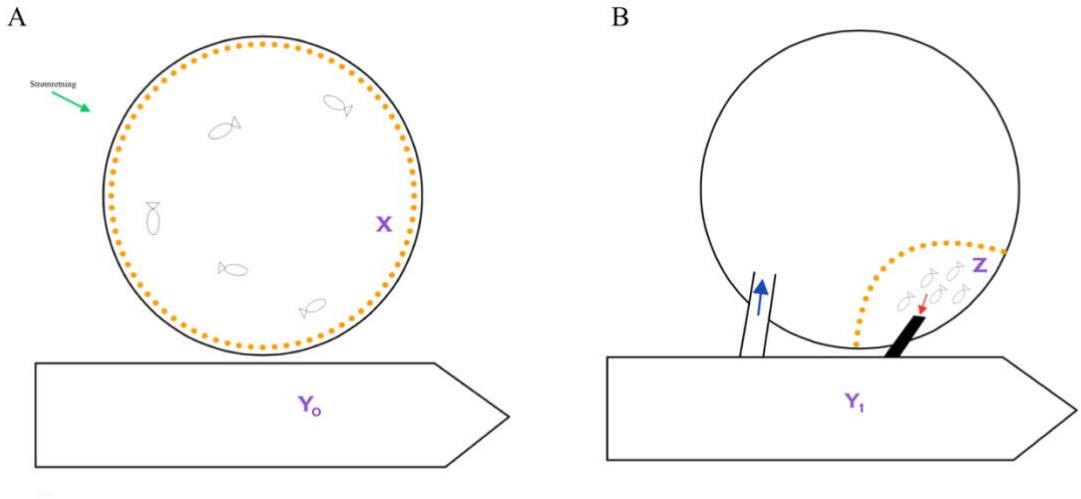
Lokalitet B består av syv merder med atlantisk lak. Her ble det under behandlingen i september 2021 tatt vannprøver ved behandling av fire merder.

2.1.3 Behandling med Optilicer på lokalitet C

Lokalitet C består av ti merder med atlantisk laks, og her ble det tatt vannprøver fra de fem merdene som skulle behandles over to dager. Merd 1, 6, 7, 8 og 9 ble behandlet i oppramset rekkefølge.

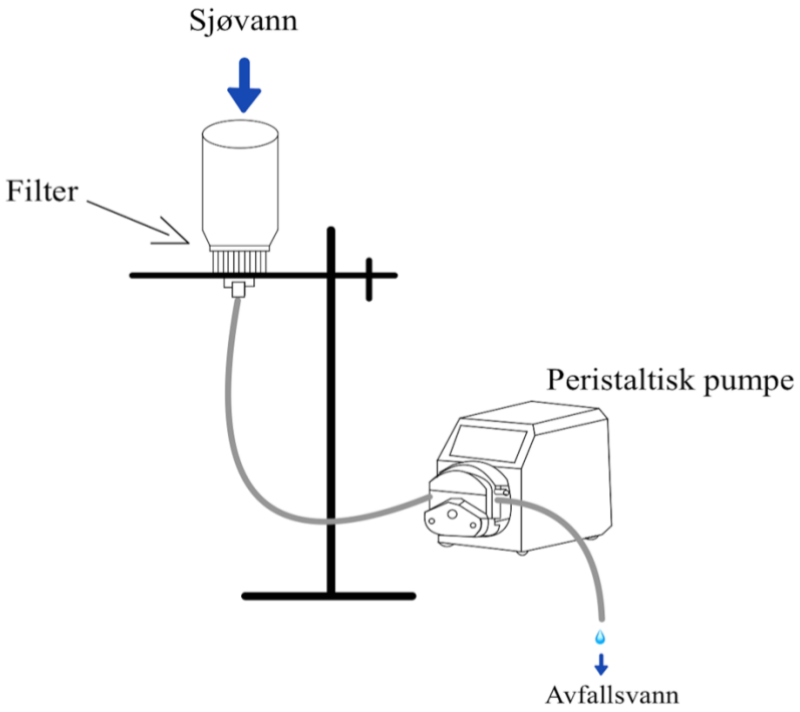
2.2 Prøveuttak

2.2.1 Vann



Figur 2.2 Illustrasjon av vannprøvetaking under avlusning, før trenging (A) og under trenging (B). X markerer hvor vannprøver fra merden ble tatt i forkant av behandlingen, Y_0 indikerer prøvetakingssted fra behandlingskammer ombord i behandlingsbåten før oppstart, Z markerer sted for vannprøvetaking under trenging av fisk før den pumpes ombord i båten (rød pil), Y_1 behandlingskammer etter at fisken fra en merd var ferdig behandlet og ført tilbake til merden (blå pil). Grønn pil indikerer strømretningen i sjøen.

Det ble tatt vannprøver fra vannoverflaten nedstrøms i merdene før behandling, i kastet hvor fisken ble trengt, og fra skumlaget som dannes i merden etter endt behandling (figur 2.2). I tillegg ble det tatt vannprøver fra behandlingskammeret i Optiliceren før oppstart, og etter hver merd som var behandlet. Samtlige vannprøver ble samlet i 500 ml sterile plastflasker. Vannprøvene ble oppbevart i isoporkasser med kjøleelement frem til ankomst på Veterinærinstituttet i Bergen, hvor de ble oppbevart i kjøl med 4 °C frem til filtrering innen 24 timer.



Figur 2.3 Illustrasjon av filtrering av sjøvann med peristaltisk pumpe.

Vannprøvene ble filtrert med en peristaltisk pumpe (figur 2.3) gjennom Thermo Scientific Nalgene Analytical Test Filter Funnels 0.45 MIC, 250 ml (Thermo Fisher Scientific). Filtrene ble overført til 5 ml eppendorfrør med sterile engangspinsetter, og lagret ved -20 °C frem til videre prosessering.

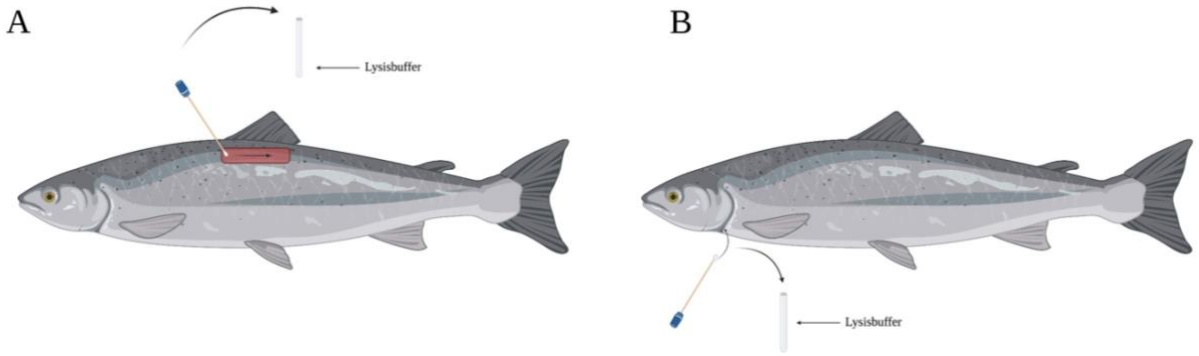
2.2.2 Fisk

Ved avlusningene på lokalitet A tok tilsette ut 4-5 «svimere» fra hver merd etter endt behandlingen, som det ble utført prøveuttak fra på lokaliteten. Det ble tatt ut prøver til histologi, bakteriologi og PCR.

Prøver til analyse med real time PCR ble tatt fra midtnyre og hjertet. Vevsbiter på størrelse med et fyrstikkhode ble lagt i eppendorfrør med RNAlater, størrelsen på vevsbiten var maksimalt 1:10 av RNAlater volumet. Prøvene ble oppbevart kjølig frem til ankomst på Veterinærinstituttet i Bergen, hvor de videre ble oppbevart i frys ved -20 °C frem til ekstraksjon av DNA.

Fra midtnyren og eventuelle sår ble det utført bakterieutstryk på blodagar med 2 % NaCl ved hjelp av en steril engangspodenål. Agarskålene ble inkubert ved 22 °C i opptil 9 dager.

Det ble tatt ut vevsprøver fra gjelle, pseudobrank, hjerte, nyre, lever, milt, pylorus, hud og muskel, øye og hjerne, som ble lagt på 10 % bufret formalin frem til preparering av histologisnitt. Det ble brukt en beholder med formalin per individ, og forholdet mellom vev og formalin var maksimalt 1:10. Fra gjellene ble det prøvetatt 2 cm av gjellebue nummer to på venstre side nedenfor vinkelen. Hele pseudobranken fra venstre side ble fiksért. Hjertet ble dissekert ut, og det ble snittet vertikalt gjennom for- og hjertekammer, før de ble lagt i formalin. Hud og muskelprøve ble tatt på tvers av sidelinjen under ryggfinnen for å inkludere både hvit og rød muskulatur. Fra lever og milt ble det skåret ut skiveformede vevsbiter. Prøve fra nyren ble skjært ut på tvers av midtnyren slik at kapselen og hematopoetisk- og ekskresjonsvev ble med. Pylorus ble kuttet på tvers i en skiveformet vevsbit. Fra øyet ble det snittet av en bit ytterst, og resten ble fiksért i formalin. Hjernen ble dissekert ut og fiksért hel.



Figur 2.4 Illustrasjon av svaberprøver tatt fra hud (A) og gjeller (B). Figur laget med BioRender.com.

Ved avlusningen på lokalitet A i oktober ble det i tillegg tatt svaberprøver av hud under ryggfinnebasis (figur 2.4 A), og gjeller (figur 2.4 B) som ble lagt i 1,5 ml lysisbuffer. Grunnet mangel på lysisbuffer ble det tatt gjellesvaber fra 14 fisker, og hudsvaber av fire fisker.

For å hindre kontaminering mellom fiskene i felt ble skalpell og pinsett skylt i klor og 70 % etanol for å sterilisere utstyret mellom hver fisk. I tillegg ble det byttet skalpellblad mellom hvert individ og mellom vevsprøvene til real time PCR hos hvert individ.

2.3 Naturlig forekomst av *P. atlantica* gv. *salmonicida* i PO 3 og 4

For å undersøke om *P. atlantica* gv. *salmonicida* forekommer i sjøvann som ikke er i direkte nærhet med lakseoppdrett ble det tatt vannprøver á 500 ml fra ti ulike områder rundt Bergen. Prøvene ble tatt like under vannoverflaten, og alle prøvene ble lagret ved ca. 4 °C frem til filtrering innen 24 timer. DNA ble ekstrahert og analysert med real time PCR mot *P. atlantica*

gv. *salmonicida.* I tillegg ble ekstrahert DNA fortynnet 1:10, og analysert med konvensjonell PCR (se avsnitt 2.8) med primere mot 16S rRNA (tabell 2.4). PCR produkt ble visualisert i en agarosegel (se avsnitt 2.9).

2.4 Fenotypisk karakterisering av isolerte bakterier

Dyrkning fra syk fisk på bakteriemedier, er en av flere metoder som kan benyttes for å avklare om fisken er infisert av en eller flere bakterier. Ulike bakterier har svært varierende krav til nærings- og vekstbetingelser, og vokser dermed på ulike dyrkingsmedier. Grunnet mikroorganismenes ulike krav til hvilke næringsstoffer de kan ta opp og utnytte er det store variasjoner i mediene. Vekstmediene er sammensatt slik at de på basis av vekst og andre karakteristika kan brukes til å identifisere de ulike mikroorganismene. En kan dele mediene inn i gruppene: ikke-selektive medier, selektive medier og differensialmedier. Ikke-selektive medier inneholder et rikt utvalg av næringsstoffer hvor de fleste bakterier kan vokse. Selektive medier inneholder stoffer som hemmer veksten av noen bakteriegrupper, men tillater vekst av en eller flere målbakterier. Differensialmedier inneholder substanser som gjør at det blir større forskjeller i utseende på ulike bakteriekolonier.

For å identifisere bakterier kan en benytte seg av fenotypisk karakterisering hvor fysiske og metabolske egenskaper studeres. Fenotyping grupperer organismer i henhold til deres likheter i egenskaper, som er resultat av uttrykking av deres genotype (van Belkum et al., 2007). Fenotyping kan inkludere kolonimorfologi, farge, lukt og andre makroskopiske egenskaper, i tillegg til å se på egenskaper som krever spesialiserte metoder for undersøkelse. Metoder som kan benyttes er for eksempel gram-farging, forskjeller i enzymproduksjon, observasjon av syreproduksjon fra karbohydrater under aerobt og anaerobt forhold (OF-test), og oksidaseproduksjon.

2.4.1 Kolonimorfologi

Vekst på blodagar med 2 % NaCl, inkubert ved 22 °C ble undersøkt etter 48 timer, 72 timer og 9 dager etter prøvetaking. Fra kolonier med morfologi forenelig med *Pasteurella*, eller andre dominerende kolonityper ble det sådd ut sekundærutstryk før det ble utført videre identifikasjonsmetoder av renkulturer. For nøyaktige resultater er det viktig å dyrke frem renkulturer med én mikroorganisme alene, uten tilblanding av andre arter. Kolonimorfologi herunder form, farge, størrelse og eventuell hemolyse ble beskrevet. Bakteriers evne til

hemolyse refererer til evne til å bryte ned røde blodceller (erytrocytter), og deles inn i α-hemolyse, β-hemolyse og an-hemolyse. α-hemolyse er delvis nedbrytning av erytrocyttene og kan observeres som grønn/brun avfarging av blodcellene på agaren. β-hemolyse er fullstendig nedbrytning av røde blodceller som sees som en klar sone rundt bakteriekoloniene på blodagaren. Anhemolyse er betegnelsen som brukes dersom det ikke er nedbrytning av blodcellene.

2.4.2 Oksidativ/Fermentativ-test (OF-test)

En OF-test undersøker bakteriers evne til å produsere syre fra glukose under aerobe og anaerobe forhold. To rør per isolat med forgjæringsmedium bestående av glukose og en pH-indikator ble kokt og avkjølt. Bakteriene ble inokulert i rørene, og ett av rørene for hvert av isolatene ble proppet med parafinvoks for å hindre tilgang til oksygen. Rørene ble inkubert ved 22 °C. Oksidativ metabolisme indikeres ved dannelse av syre, som fører til fargeomslag fra rød til gul i mediet med tilgang på oksygen. Fermentativ metabolisme indikeres ved dannelse av syre, ved fargeomslag fra rød til gul i mediet uten tilgang på oksygen. Dersom ingen av mediene har fargeomslag indikerer dette at bakterien ikke metaboliserer glukose.

2.4.3 Oksidaseproduksjon

Oksidasetesten brukes for å bestemme bakteriens evne til å produsere enzymet cytokrom c, som deltar i det siste trinnet i elektrontransportkjeden. Mikroorganismer kan derfor deles inn i to grupper, oksidase positive som har cytokrom c som en del av deres respirasjon, og oksidase negative, som ikke har det. Ved tilstedeværelse av cytokrom oksidaseenzymet oksideres reagenten (oksidasestripsen) noe som fører til dannelse av en blåfarge. Testen utføres ved å overføre en liten mengde bakterier fra agarskål til en BBL DrySlide™ Oxidase (Becton Dickinson) ved hjelp av en steril podenål. Resultatet avleses innen 20 sekunder.

2.4.4 Gram farging

Celleveggen til bakterier kan vanligvis farges blåfiolett med en kombinasjon av krystallfiolett og jod. Ved tilsetting av alkohol så vil gram-negative bakterier avfarges, mens gram-positive vil beholde fargen. Etter kontrastfarging med et rødt fargestoff blir de gram-negative bakteriene røde, mens de gram-positive bakteriene forblir blåfiolette (Gram, 1884).

Først ble det laget et mikroskopipreparat (vedlegg 1) av bakteriekulturen som skulle farges. Deretter ble bakteriene dekket med Bacto Gram Crystal Violet, som ble skylt av med spring vann etter 1 minutt. Videre ble bakteriene dekket med Bacto Gram Iodine som virket i 1 minutt, før fargen skylles av. Så ble bakteriene avfarget med Bacto Gram Decolourizer. Til slutt farges bakteriene med Bacto Gram Safranin i 30-60 sekunder før det skylles av med springvann.

2.5 MALDI-TOF; Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight

MALDI-TOF er en massespektrometri-metode som baserer seg på ioniseringen av et prøvemateriale som beskytes med en laser (Wieser et al., 2011). Bakterier dyrket på et fast medium ble overført til en stålplate ved hjelp av en tannpirker. Bakteriene ble dekket med 1 µl matrix, som inneholder blant annet maursyre som ødelegger celleveggen til mikrobene, og satt inn i maskinen som transporterer platen til et målekammer i vakuum. Deretter ble prøvene bestrålet av korte laser-pulser som sammen med matrixen fører til at proteiner fragmenteres og ioniseres. Videre ble molekylmassen og ioniseringen til fragmentene detektert, hvorav de ribosomale proteinene har stor betydning (Wieser et al., 2011). Dette proteinmønstret ble så sammenlignet med tusenvis av referansespekter av mikroorganismer fra MALDI-TOF databasen. Det blir fremstilt en automatisk resultatrapport til hver prøve, som bygger på en sammenligning av prøvens spekter mot spektrene i databaser, og i hvilken grad de stemmer overens. I resultatrapporten blir det oppgitt en treffverdi som sier noe om likheten mellom prøven og lagrede data i databasen, og gir informasjon om validiteten av identifikasjonen. Denne overensstemmelsen normaliseres til et tall mellom 0 og 1000, fra ingen til full overensstemmelse. Treffet i resultatrapporten er logaritmen til dette tallet. Treffverdi >2 regnes som godt pålitelig og sannsynlig identifikasjon, treffverdi mellom 1,70 og 1,99 regnes som dårlig treff og mindre sannsynlig. Ved treffverdi <1,70 er identifikasjon ikke mulig. Ved hver analyserunde med MALDI-TOF ble identifiserte renkulturer med *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* kjørt sammen med prøvene som skulle identifiseres, som positive kontroller.

2.6 Optimalisering av vannfiltrering og lagring av vannprøver

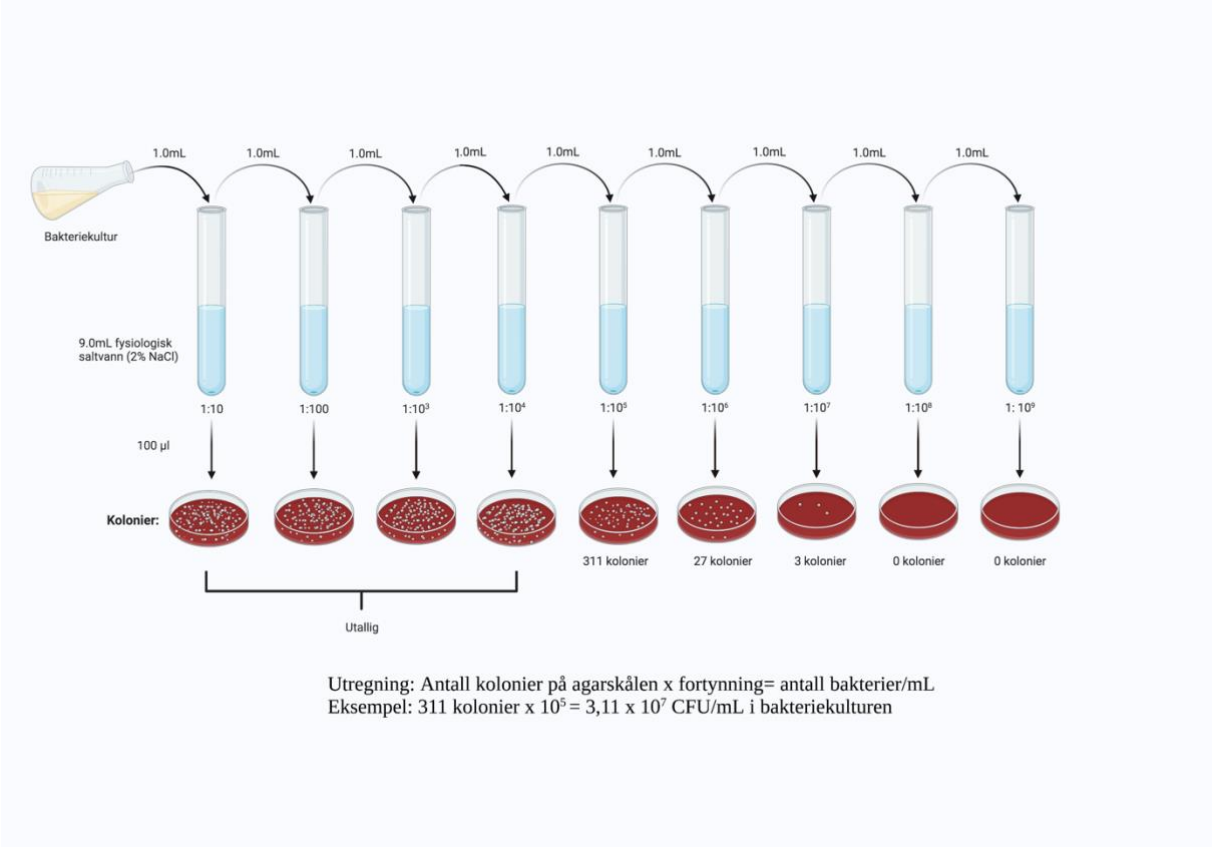
For å undersøke om pumpehastigheten av vann gjennom filteret, lagring over tid og lagringstemperatur av vannprøvene påvirker påvisningen av *Pasteurella*, ble en bestemt mengde bakterier tilsatt naturlig ikke-sterilisert sjøvann hentet fra Puddefjorden i Bergen.

2.6.1 Dyrkning av bakterier til laboratorieforsøk

Først ble et kjent isolat av *P. atlantica* gv. *salmonicida* (VIO 11693) hentet opp fra -80 °C fryser, podet ut på blodagar med 2 % NaCl, og inkubert ved 22 °C frem til vekst av kolonier. En liten mengde med bakteriekolonier ble suspendert i Tryptic Soy Broth (TSB) med 2 % NaCl og 10 % foetal calf serum (FCS), og videre inkubert ved romtemperatur (ca. 22 °C) med 200 rpm risting i 20-41 timer.

For å estimere antall bakterier i bakteriekulturene ble det målt optisk tetthet (OD). I denne studien ble OD målt i et spektrofotometer (Genesys 10S VIS spektrofotometer, ThermoFisher) ved 600 nm bølgelengde. Før måling ble spektrofotometeret nulljustert med vekstmediet brukt til dyrkning. Målinger ble gjennomført ved å tilsette 2,0 ml av bakteriesuspensjon til 2,5 ml makro plast-kuvetter (Brand), og plassert i spektrofotometeret. For å estimere antall levedyktige bakterier i bakteriekulturene ble CFU/ml (kolonidannende enhet/«colony forming units») beregnet. Først ble det laget en ti-folds fortynningsrekke av høstet bakteriekultur i fysiologisk saltvann med 2 % NaCl (Figur 2.5). 100 µl av hver fortynning ble overført til blodagar med 2 % NaCl, og spredt forsiktig utover agaren ved hjelp av en steril L-formet stav. Agarskålen ble inkubert ved 22 °C frem til det ble dannet kolonier (opp til 120 timer). Koloniene på agarskåler med tellbare kolonier ble telt, og CFU/ml ble kalkulert ved å bruke formel (1):

(1) $$Antall\ celler\ CFU/ml = \frac{Antall\ kolonier\ per\ agarskål}{Fortynningsfaktor}$$



Figur 2.5 Illustrasjon av 1:10 fortynningsrekke av bakteriekultur, etterfulgt av utstryk på blodagarskåler. Figur laget med BioRender.com

2.6.2 Filtreringshastighet

For å undersøke om pumpehastigheten av vann gjennom filteret hadde påvirkning på deteksjon av mål-DNAet ble sjøvann tilsatt en bestemt mengde bakterier filtrert med ulike pumpehastigheter. Først ble 10 autoklaverte glassflasker fylt med 500 ml ikke-sterilisert sjøvann fra Puddefjorden i Bergen. Deretter ble det tilsatt 500 µl bakteriekultur (OD 0,145) til hver flaske med 500 ml sjøvann, som ble filtrert gjennom Thermo Scientific Nalgene Analytical Test Filter Funnels 0.45 MIC, 250 ml (Thermo Fisher Scientific). Det ble filtrert to paralleller hver ved pumpehastighetene 100, 200, 400, 700 og 1000 ml/min. Det ble også filtrert to flasker á 500 ml uten tilsatt bakterier på 100 og 1000 ml/min, som negative kontroller. Filtrene ble overført til 5 ml eppendorfrør med sterile engangspinsetter, og lagret i frys ved -20 °C frem til videre prosessering.

2.6.3 Effekt av lagring over tid på assay sensitivitet

Noen av vannprøvene som er analysert i dette studiet ble sendt med Posten, og det gikk flere dager fra prøvene ble tatt til de ble filtrert. Det ble derfor gjort to forsøk for å undersøke om lagring over tid og lagringstemperatur kunne være faktorer som påvirket deteksjon grunnet

degradering av *Pasteurella*-bakteriene i vannet. Autoklaverte glassflasker fylt med 500 ml sjøvann fra Puddefjorden ble tilsatt *P. atlantica* gv. *salmonicida*, og lagret ved 4 °C og 22 °C frem til filtrering. Vannet ble filtrert etter henholdsvis 0, 24 timer, 48 timer, 72 timer, 120 timer, 168 timer og 216 timer. Dette ble gjort to ganger, én med bakteriekultur med OD 0,188 og én med OD 0,002.

2.7 DNA-ekstraksjon

2.7.1 DNA-ekstraksjon fra vev og bakteriekulturer

DNA-ekstraksjon fra vev og bakteriekulturer ble gjennomført ved hjelp av High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, CA, USA). Fra vevsbitene lagt på RNAlater ble det tatt ut 25-50 mg for hvert organ som først ble mekanisk nedbrutt ved hjelp av sterile skalpellblad. Videre ble ekstraksjon og rensing av DNA utført i henhold til kitets protokoll 2.2 «Isolation og Nucleic Acids from Mammals» og 2.2 «Washing and Elution».

For ekstraksjon av DNA fra bakteriekulturer ble bakteriekolonier tilsvarende mengde som et fyrstikkhode overført til 200 µl PBS, og blandet med vortexmikser. Deretter ble løsningen sentrifugert, og cellepelleten ble resuspendert i 200 µl PBS. Videre ble ekstraksjonen utført i henhold til protokoll 2.2 «Isolation of Nucleic Acids from Bacteria or Yeast», og videre vasket etter protokoll for «Washing and Elution».

Ekstraksjonsprosessen kan deles inn i tre hoveddeler: lysis, ekstraksjon og isolering av DNA. For å lysere prøven ble det tilsatt lysisbuffer og Proteinase K for frigjøring av DNA og enzymatisk fjerning av proteiner, i et eppendorfglass sammen med vevsprøven. Dette ble blandet og deretter inkubert på 55 °C i minst en time. I det neste steget ble det tilsatt bindingsbuffer for å binde ekstrahert DNA til kolonnen. Deretter ble det tilsatt isopropanol for å fjerne proteiner og andre cellulære bestanddeler. I det siste steget ble det gjennomført flere vaskesteg, og det ekstraherte DNA ble eluert. For hver runde med DNA-ekstraksjon ble det laget en rensekontroll uten vev/bakteriekolonier, for å detektere eventuell kontaminering under ekstraksjonsprosessen. Prøvene ble lagret i fryser ved -20 °C frem til videre analyser.

2.7.2 DNA-ekstraksjon fra nitrocellulose filtre

DNA fra nitrocellulosefilter ble ekstrahert ved hjelp av en modifisert fremgangsmåte fra Quick-Start Protocol fra DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Filtret ble overført til et 5 ml rør og tilsatt en miks av 720 µl ATL (Tissue Lysis) buffer og 80 µl Proteinase K, og blandet på vortex i 15 sekunder. Deretter ble lokket på røret forseglet med parafilm, og inkubert ved 56 °C med 200 rpm risting i 24 timer. Videre ble lysatet pipettert over i et 5 ml LoBind rør, og tilsatt AL (Lysis) buffer og etanol i et 1:1:1 ratio (lysat:AL buffer:etanol), og blandet med vortex. 650 µl av blandingen ble overført til en DNeasy Mini spinn kolonne og sentrifugert ved 6000 *g* i 1 minutt. Dette ble gjentatt til alt lysat hadde passert kolonnen. Det ble så tilsatt 500 µl AW1 (Wash buffer) i kolonnen som så ble sentrifugert ved 6000 g i 1 minutt. Det samme ble gjentatt med 500 µl AW2. Kolonnen ble så overført til et 2 ml oppsamlingsrør og sentrifugert i tre minutter på maksimal hastighet (16 100 *g*) for å tørke kolonnen. Til slutt ble DNAet ekstrahert fra kolonnen ved å overføre den til et nytt 2 ml eppendorfrør, som ble tilsatt 100 µl AE (Elution) buffer. Dette ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur, før det ble sentrifugert ved 6000 *g* i ett minutt. Renhet og konsentrasjon av DNAet ble målt (se avsnitt 2.7.4), og DNAet ble oppbevart ved -20 °C frem til videre analyse.

2.7.3 Isolering av DNA fra svaberprøver

Isolering av DNA fra svaberprøvene som ble lagt i lysisbuffer ble utført ved hjelp av en modifisert protokoll i High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Først ble eppendorfrøret med svaberen blandet godt på vortex, før svaberet ble fjernet, og røret ble sentrifugert i 10 minutter på 3000 *g* i romtemperatur. Cellepelleten ble resuspendert i 200 µl PBS. Deretter ble kitets protokoll 2.2 for «Isolation of Nucleic Acids from Bacteria or Yeast» fulgt fra punkt 2. Videre ble nukleinsyrene renset og vasket etter kitets protokoll 2.2 «Protocol for Washing and Elution». Løsningen med det ekstraherte DNAet ble lagret ved -20 °C frem til videre prosessering med real time PCR.

2.7.4 Bestemmelse av templat DNA-kvalitet og mengde

Konsentrasjon (ng/µl) og renhet av det ekstraherte DNAet (templat) ble målt ved hjelp av Themo Scientific NanoDrop^{TM} Spectrophotometer. Instrumentet måler absorbans av molekyler i løsningen ved en gitt bølgelengde. Absorbsjonsforholdet 260/280 og 260/230 kan gi en indikasjon på renheten av DNAet. Nukleinsyrer absorberer lys ved 260 nm, proteiner absorberer lys ved 280 nm og andre kontaminanter som fenoler absorberer lys ved 230 nm.

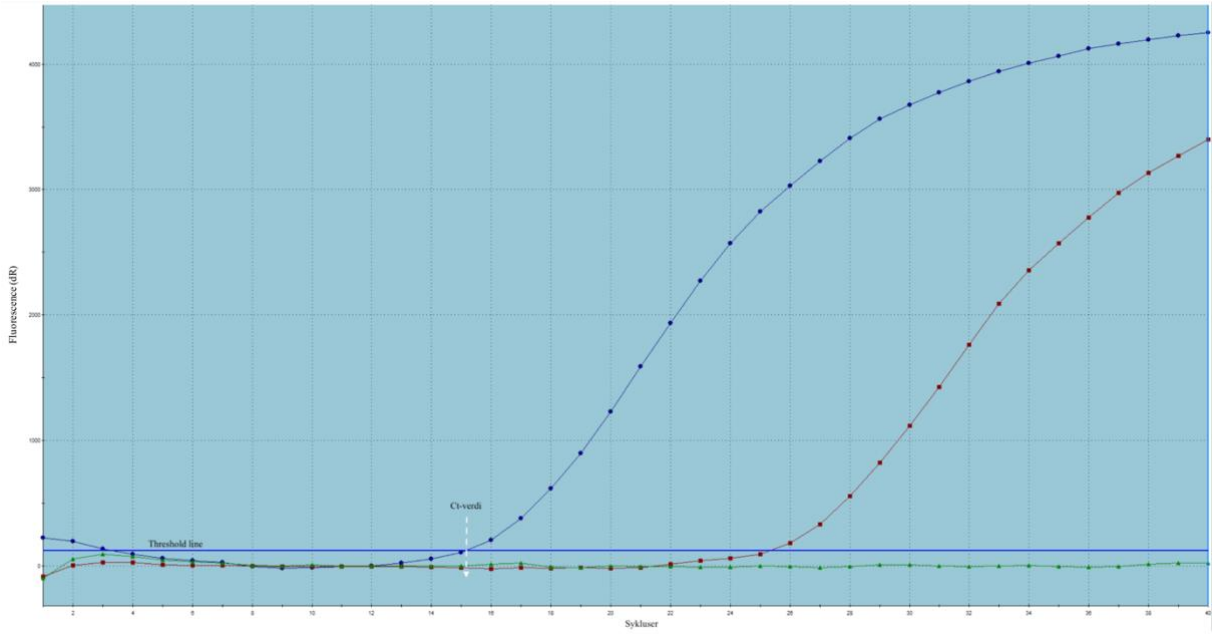
Verdier over 1,8 for A260/A280 forholdet, og mellom 1,8 og 2,2 for A260/A230 indikerer «rent» DNA (Desjardins & Conklin, 2010). Verdier som avviker signifikant fra disse indikerer forurensning av proteiner, fenoler eller andre kontaminanter.

2.8 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode for eksponentiell amplifisering av en bestemt RNA- eller DNA-sekvens (RNA må først gjøres om til cDNA ved hjelp av revers transkriptase). Metoden brukes for å syntetisere nye komplementære tråder fra nukleinsyresekvenser i en prøve ved hjelp av sekvensspesifikke primere. Teknikken baseres på termiske sykluser med gjentatt oppvarming og nedkjøling. Hver syklus består av tre trinn: denaturering, annealing og elongering. I en syklus blir prøven først utsatt for høy temperatur for å denaturere de to DNA-trådene til enkelttråder. Deretter senkes temperaturen og primerne og oligonukleotider som er sekvensspesifikke vil binde seg til målsekvensen på enkelttrådene (annealing). DNA-polymerase vil så elongere nye komplementærtråder ut fra primerne, og syklusen er dermed sluttet. Denne syklusen gjentas ønsket antall ganger.

2.8.1 Real time polymerase kjedereaksjon (PCR)

Det ekstraherte DNAet ble analysert med real-time PCR for å påvise eventuell tilstedeværelse av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida.* I en real-time PCR kan amplifikasjonen av måltemplatet registreres i sanntid under reaksjonen, på grunn av et fluorescensmolekyl som blir frigjort når proben binder spesifikke sekvenser. Fluorescenssignalet øker proporsjonelt med mengden replikert DNA. Ut ifra dette kan en se hvor mange amplifikasjonssykluser det tar før en har nådd en bestemt terskel. Ct-verdien er antall sykluser det tar for at fluorescenssignalet når den bestemte terskel-verdien. Dersom det er mye måltemplat i prøven vil det resultere i en lav Ct-verdi, mens en høy Ct-verdi indikerer lite måltemplat. Fordelen med real time PCR fremfor konvensjonell PCR er at man kan skille mellom prøver som har mer eller mindre mengde av målsekvensen ut ifra Ct-verdien. I figur 2.6 er det illustrert amplifikasjonskurvene til tre prøver: en negativ og to positive. Den grønne kurven har fått resultatet «ingen Ct-verdi», som indikerer ingen tilstedeværelse av mål-DNAet i prøven. Den blå og røde kurven resulterer i to ulike Ct-verdier, ut ifra hvor kurvene krysser grenseverdien (Threshold line). Den blå kurven har en Ct-verdi som er lavere enn den røde kurven, som indikerer at det er mer DNA fra målorganismen i templatet til den blå kurven.



Figur 2.6 Amplifikasjonskurver fra real time PCR analyse. PCR-sykluser på x-aksen og logaritmen til fluorescence på Y-aksen. Ct-verdiene representerer antall PCR-sykluser før mengde fluorescens krysser terskelverdi/«Threshold line» (blå linje), og er markert med grå pil. Blå og rød kurve har sigmoid form, og har gitt positive resultater med Ct-verdi 18,4 og 28,7. Grønn kurve krysser ikke terskelverdien, og gir resultatet «ingen Ct-verdi».

Først ble det tilsatt 16 µl mastermix i hver brønn. Mastermixen (tabell 2.2) inneholdt blant annet termostabil DNA-polymerase, en revers og en forward primer, og en probe (tabell 2.1) som er spesifikk for målsekvensen og avgrenser området som skal amplifiseres opp. Videre ble det tilsatt 4 µl templat i hver av brønnene. I tillegg til templat var det en positiv kontroll, en rensekontroll og en NTC (non template control). Rensekontrollen blir brukt for å detektere eventuell kontaminering under DNA-ekstraksjon. NTC anvendes for å avsløre om det er forurensninger i reagensene eller et forhøyet bakgrunnssignal av fluorescens i analysen. Brønnene ble så sentrifugert for å blande templat og mastermix, og fjerne eventuelle luftbobler. Real time PCR-analyse ble kjørt i Agilent Technologies Stratagene Mx3005P.

Tabell 2.1 Komponentene i mastermix med oppgitt volum og konsentrasjon. Volumet korresponderer til én analyse.

Komponent	Konsentrasjon i reaksjonsmiks	Volum (µl)
Nukleasefritt vann		1,2
Brilliant III Ultra-Fast Q-PCR Master Mix		10
F Primer	900 nM	1,8
R Primer	900 nM	1,8
Probe	600 nM	1,2
Totalt		16,0

Tabell 2.2 Primer og prober for assay brukt i real-time PCR analyser.

Assay	Primer	Primersekvens (5`→ 3`)	Referanse
Pasteurella sp.	Probe	ACTTGATGAAGCTACACAACGTG	(Sandlund et al., 2021)
	Forward	TCTAATATTGATGATCTTGTTTG	(Sandlund et al., 2021)
	Reverse	ATTTCCTAAATTAGGAAAGATAC	(Sandlund et al., 2021)

I real time PCR maskinen inkuberes prøvene først ved 50 °C i 15 minutter. Deretter aktiveres polymerasen i to minutter ved 95 °C. Amplifikasjon av templatet består av 40 sykluser ved 95 °C i fem sekunder (denaturering), og 57 °C i 45 sekunder (annealing og elongering). Amplifikasjonskurvene ble studert ved å bruke MxPro (Agilent). Kurvene ble visuelt undersøkt for avvikende form. Threshold line ble satt automatisk over bakgrunnsstøy av programmet.

2.8.2 Regresjonskurve

Amplifikasjonens effektivitet ble undersøkt ved å lage og analysere en 1:10 fortynningsrekke (10^0-10^{-6}) med et *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* templat med kjent konsentrasjon (72,0 ng/µl). Ct-verdiene blir så plottet i en standardkurve for å kalkulere stigningstallet og regresjonstallet (R^2) til assayet. Amplifikasjonskurven vil fordele seg med lik avstand mellom hver fortynning ved optimal effektivitet. Et stigningstall nært -3,32 regnes som ideelt, og vil gi en effektivitet nær det teoretiske maksimum på 1,00 (100 %) (Bustin et al., 2009). Stigningstallet ble videre brukt for å beregne effektiviteten til amplifiseringen med formel (2). Regresjonstallet indikerer hvorvidt grafen er lineær, og bør være tilnærmet 1.

(2) $E = 10^{\frac{-1}{stigningstall}} - 1$

2.8.3 Spesifisitetstest

Spesifisiteten til et assay er en parameter som sier noe om at primerne eller proben ikke krysshybridiserer med nukleinsyrer fra andre arter, og dermed gir falske positive resultater. Assayet brukt mot *Pasteurella* sp. (Sandlund et al., 2021) ble testet mot ulike bakterieisolater vist i tabell 2.3. For å verifisere tilstedeværelse av amplifiserbart templat-DNA av de respektive ikke-target artene ble det videre kjørt PCR med universelle S20 og A18 primere (Tabell 2.4). For visualisering av PCR-produktene ble det benyttet agarose gel-elektroforese.

Tabell 2.3 Oversikt over bakterieisolater spesifisitetstestet mot Pasteurella sp.-assay fra Sandlund et al., (2021).

Bakteriearter	**Stammedetaljer**
Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida*	VIB-5363
Aliivibrio logei	*50-1575*
Carnobacterium maltoaromaticum	*50-3457*
Moritella viscosa	*ViB-5591*
Pasteurella atlantica gv. *cyclopteri*	*VIB-5284*
Pasteurella atlantica gv. *salmonicida*	*VIO-11693*
Pasteurella hemolytica	*Eske 2, p-37*
Pasteurella multocida	*Eske 2, p-21*
Pasteurella skyensis (norsk isolat)	*VIB-4344*
Pasteurella skyensis (skotsk isolat)	*VIB-8301*
Phoecenobacteri uteri	*VIB-5283*
Photobacterium damselae subsp. *piscicida*	*50-3219*
Pseudomonas anguilliseptica	*VIB-5182*
Tenacibaculum finnmarkense subsp. *finnmarkense*	*50-756*
Vibrio anguillarum	*50-1161*
Yersinia ruckeri	*VIB-5363*

2.9 16S ribosomalt RNA (rRNA) sekvensering

For å identifisere bakterier som ikke lar seg sikkert identifisere ved hjelp av morfologi, biokjemiske tester, eller som ikke har en profil i MALDI-TOF-databsen kan en benytte sekvensering og sammenligning av 16S rRNA genet. 16S rRNA gensekvensen er høyt konservert blant bakterier, men varierer nok til identifisering av de fleste forskjellige bakteriearter. Sekvensen er omtrent 1550 basepar (bp) lang, og består av både variable og konserverte regioner, hvorav de første 500 bp er mest variable (Clarridge, 2004). Primere er vist i tabell 2.4, og amplifiserer de ca. 500 første baseparene av 16S genet (Suau et al., 1999). En mastermix med komponentene i tabell 2.5 ble laget, og det ble tilsatt 16 µl mastermix og 4 µl templat i hver brønn. Prøvene ble sentrifugert og satt inn i en PCR maskin (SureCycler 8800, Agilent Technologies). I maskinen skjer det først en initiell denaturering i tre minutter ved 95 °C. Videre ble PCR produktet amplifisert i 30 sykluser med: ett minutt ved 95 °C (denaturering), ett minutt ved 56 °C (annealing) og ett minutt ved 72 °C (ekstensjon). Avslutningsvis skjer en endelig ekstensjon i fem minutter ved 72 °C. Amplifisert PCR-produkt ble oppbevart ved 4 °C frem til videre prosessering. For å identifisere ukjent bakterieisolat ble PCR-produktet sendt til Veterinærinstituttet på Ås for sangersekvensering.

Tabell 2.4 Primere brukt til 16S rRNA PCR-analyser av ca. 500 bp, hentet fra Suau et al., 1999.

Primernavn	Primer	Primersekvens (5`→ 3`)	Referanse
S20	Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(Suau et al., 1999)
A18	Reverse	GWATTACCGCGGCKGCTG	(Suau et al., 1999

Tabell 2.5 Komponentene i mastermix til 16S rRNA PCR-analyse med oppgitt volum og konsentrasjon. Volumet korresponderer til én analyse.

Komponent	Konsentrasjon i reaksjonsmiks	Volum (µl)
5xGreen GoTaq Flexi buffer		4,0
Nukleasefritt vann		8,0
$MgCl_2$ Solution		1,5
dNTP		0,4
F Primer (S 20)	500 nM	1,8
R Primer (A18)	500 nM	1,8
Go Taq G2 Flex DNA polymerase (Promega)		1,2
Totalt		16,0

For visualisering av PCR-produkt fra 16S amplifisering (og bakterieisolater fra spesifisitetstest) ble det utført gel-elektroforese. Prinsippet går ut på at et elektrisk felt separerer DNA-fragmenter i en agarose gel. Hver ende av elektroforesekaret som gelen ble plassert i har en elektrodebuffer med en negativ, og en positiv pol. På grunn av den elektriske spenningsforskjellen vandrer negativt ladede molekyler, altså DNAet mot den positive polen. DNAet vil sorteres i bånd hvor store molekyler vandrer langsommere enn små molekyler. Vandringshastigheten er avhengig av blant annet porestørrelse i gel som bestemmes av konsentrasjonen av agarose, tid, molekylstørrelse og spenningen som kobles til.

Gel ble laget ved å tilsette 1 gram (1 %) agarose til 100 ml 1XTBE-buffer. Agarosen ble løst opp i bufferen ved å koke blandingen i mikrobølgeovn i ca. 1 minutt. Løsningen ble avkjølt før det ble tilsatt 10 µl GelRed™ (Biotium). Dette fluorescerende stoffet farger nukleinsyrer, og er ekstremt følsomt og stabilt. Blandingen ble overført til et støpekar med «kammer» i, for å lage brønner. Da gelen var stivnet ble kammene fjernet, gelen ble overført til et elektroforesekar og dekket av 1XTBE-buffer. I den første brønnen ble det tilsatt 3 µl PCR-markør (PCR Marker 50 lanes, Promega) med DNA fragmenter med størrelse på 50, 150, 300, 500, 750 og 1000 bp, disse fragmentene har lik intensitet. Det ble pipettert 5 µl PCR-produkt i hver av brønnene.

Deretter ble det tilkoblet en elektrode med 120 volt i 20 minutter. Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad) visualiserer nukleinsyrene i agarose-gelen ved hjelp av UV-lys, og presenterer et bilde i Image Lab Software.

2.10 Histologi og HE-farging

Vevsprøver på formalin til histopatologisk undersøkelse ble bearbeidet ved Veterinærinstituttet i Bergen, og utført i henhold til deres protokoll for utførelse av histologi. Vevsbitene ble først trimmet og lagt i ny formalin. Deretter ble prøvene kjørt gjennom en dehydreringsprosess i en fremføringsmaskin (Excelsior AS, Thermo Scientific). I denne prosessen blir formalin fjernet og alkohol tilsatt i seks runder for å fjerne alt vannet i vevsbitene. Videre ble det tilsatt xylen i to runder for å fjerne alkoholen, og gjør vevet tilgjengelig for impregnering med parafinvoks, som bevarer celle- og vevsstrukturer. Flytende parafinvoks på 60 °C ble tilsatt i tre runder. De impregnerte vevsbitene ble lagt i støpeformer, og støpt inn med flytende parafinvoks, satt på kuldeplate og deretter i frys. Etter prøvene var nedkjølt ble de snittet med mikrotomet Thermo Scientific HM 355S Automatic Microtome (ThermoFisher Scientific). Overflødig voks ble først snittet av før det ble snittet 2,5 µm tykke vevssnitt, som ble lagt i vannbad på 42 °C før de ble satt på objektglass (Superfrost Micro Slides).

Farging med hematoxylin og eosin (HE) ble gjennomført etter Veterinærinstituttets protokoll. Dette er en generell farging av vev som tillater histologiske observasjoner og evaluering av preparater i mikroskopi. Fargeprosessen og dekking av preparater med film ble gjort med Tissue-Tek PrismaÒ Plus og Tissue-Tek FilmÒ (Sakura, Netherlands). Preparatene ble så plassert i en varmeboks med 60 °C for å varme opp voksen. For å løse opp voksen ble preparatene så satt i xylen i to runder á fire minutter. Xylen ble så fjernet ved hjelp av alkohol, hvor preparatene ble satt 30 sekunder i alkoholrekker med henholdsvis 100 %, 96 %, 80 % og 70 % etanol. Videre ble preparatene satt i destillert vann i minimum ett minutt for å rehydreres før de ble farget med hematoxylin i ett minutt. Deretter ble preparatene vasket i vann i to minutter, før de ble farget med eosin i 2,5 minutter. Preparatene ble så vasket i 30 sekunder og satt i en ny alkoholrekke for dehydrering med lavest konsentrasjon først, henholdsvis 70 %, 80 %, 96 % og 2x absolutt alkohol (ABS). Siste steg i fargeprosessen var to runder á ett minutt i xylen. Deretter ble preparatene dekket med en dekkfilm som er løselig med xylen, før de tørkes i avtrekksskap i minimum 20 minutter før mikroskopi. Histologipreparatene ble studert i lysmikroskop på forstørrelsene x5, x10, x20, x40, og x63,5 (Leica DM2500 LED). Bilde av preparatene ble tatt med Leica MC 190 HD.

2.11 Prevalens

Prevalens er andel av en populasjon som er infisert med et spesifikt patogen, og oppgis ofte i prosent. Dette gir en indikasjon på utbredelsen av et patogen i den testa populasjonen, og beregnes med formel (3).

(3) $Prevalens\ (\%) = \frac{Antall\ positive\ prøver}{Totalt\ antall\ prøver}\ x\ 100$

2.12 Beregning av Ct-verdi med ulike volum

Noen vannprøver tettet filteret før 500 ml var filtrert, mengden som ble filtrert ble målt opp og notert. For disse vannprøvene ble Ct-verdien til samme volum så de resterende vannprøvene estimert ved hjelp av formel (4).

(4) $Ct_{v2} = Ct_{v1} + log_2 \frac{v1}{v2}$

3 Resultater

3.1 Real time PCR resultater

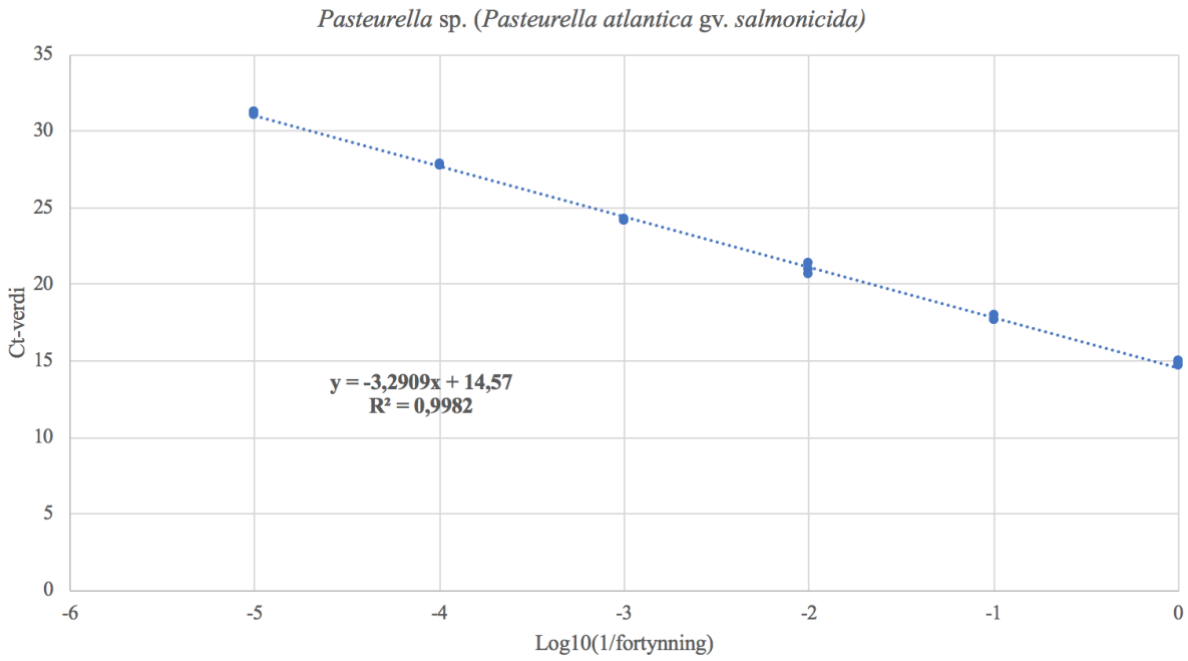
Effektivitet

Ett isolat av *P. atlantica* gv. *salmonicida* (VIO-11693) ble dyrket opp, renset og fortynnet (1:1-1:10^5) og videre analysert ved hjelp av real time PCR. Det ble analysert tre replikater fra hver fortynning. Resultatene er fremstilt i tabell 3.1.

Tabell 3.1 Fortynninger av Pasteurella atlantica gv. salmonicida bakterieisolat og Ct-verdi for hver fortynning og hvert replikat.

Fortynning	Ct-verdi
1:1	14,67
1:1	14,98
1:1	14,80
1:10	17,69
1:10	18,00
1:10	17,63
$1:10^2$	20,67
$1:10R^2$	20,93
$1:10^2$	21,40
$1:10^3$	24,12
$1:10^3$	24,27
$1:10^3$	24,17
$1:10^4$	27,84
$1:10^4$	27,79
$1:10^4$	27,80
$1:10^5$	31,28
$1:10^5$	31,26
$1:10^5$	31,04

Ct-verdiene ble plottet, og det ble utført lineær regresjon i Excel, illustrert i figur 3.14. Dette gir stigningstallet -3,2909, som videre ble brukt til å regne ut amplifiseringseffektiviteten.



Figur 3.1 Standardkurve for Pasteurella sp. (P. atlantica gv. salmonicida) assay etter Sandlund et al., 2021.

Amplifiseringseffektivitet ble beregnet med følgende formel:

$$E = 10^{\frac{-1}{-3,2909}} - 1 = 1,013$$

$$E(\%) = 1,013\ x\ 100\ \% = 101,3\ \%$$

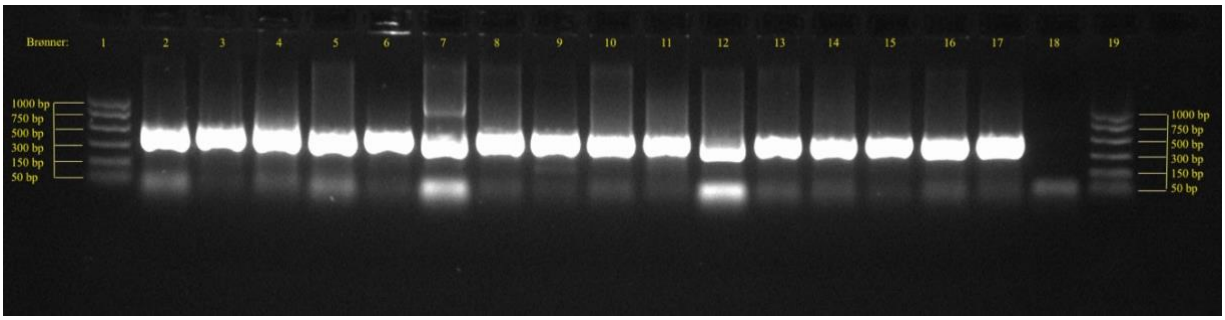
Spesifisitet

DNA fra bakterieartene listet i tabell 3.15 ble renset og analysert med real time PCR assay mot *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Alle var negative, utenom det skotske isolatet av *P. skyensis* med Ct-verdi 39,41.

Tabell 3.2 Oversikt over bakterieisolater som er renset DNA fra og kjørt mot Pasteurella sp. assay (Sandlund et al., 2021), innhold av nukleinsyrer etter DNA rensing, og Ct-verdi fra real time PCR analyse.

Bakteriearter	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi	Brønn
Vibrio anguillarum	281,1	Ingen-Ct	2
Yersinia ruckeri	47,2	Ingen-Ct	3
Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida*	144,9	Ingen-Ct	4
Aliivibrio logei	202,9	Ingen-Ct	5
Carnobacterium maltoaromaticum	190,0	Ingen-Ct	6
Moritella viscosa	500,5	Ingen-Ct	7
Pasteurella skyensis (skotsk isolat)	120,9	Ingen-Ct	8
Phoecenobacteri uteri	132,4	Ingen-Ct	9
Pasteurella skyensis (norsk isolat)	163,3	Ingen-Ct	10

Photobacterium damselae subsp. *piscicida*	685,5	Ingen-Ct	11
Tenacibaculum finnmarkense subsp. *finnmarkense*	158,8	Ingen-Ct	12
Pasteurella atlantica gv. *cyclopteri*	173,6	Ingen-Ct	13
Pseudomonas anguilliseptica	105,4	Ingen-Ct	14
Pasteurella atlantica gv. *salmonicida*	72,0	14,80	15
Pasteurella multocida	102,3	Ingen-Ct	16
Pasteurella hemolytica	44,3	Ingen-Ct	17

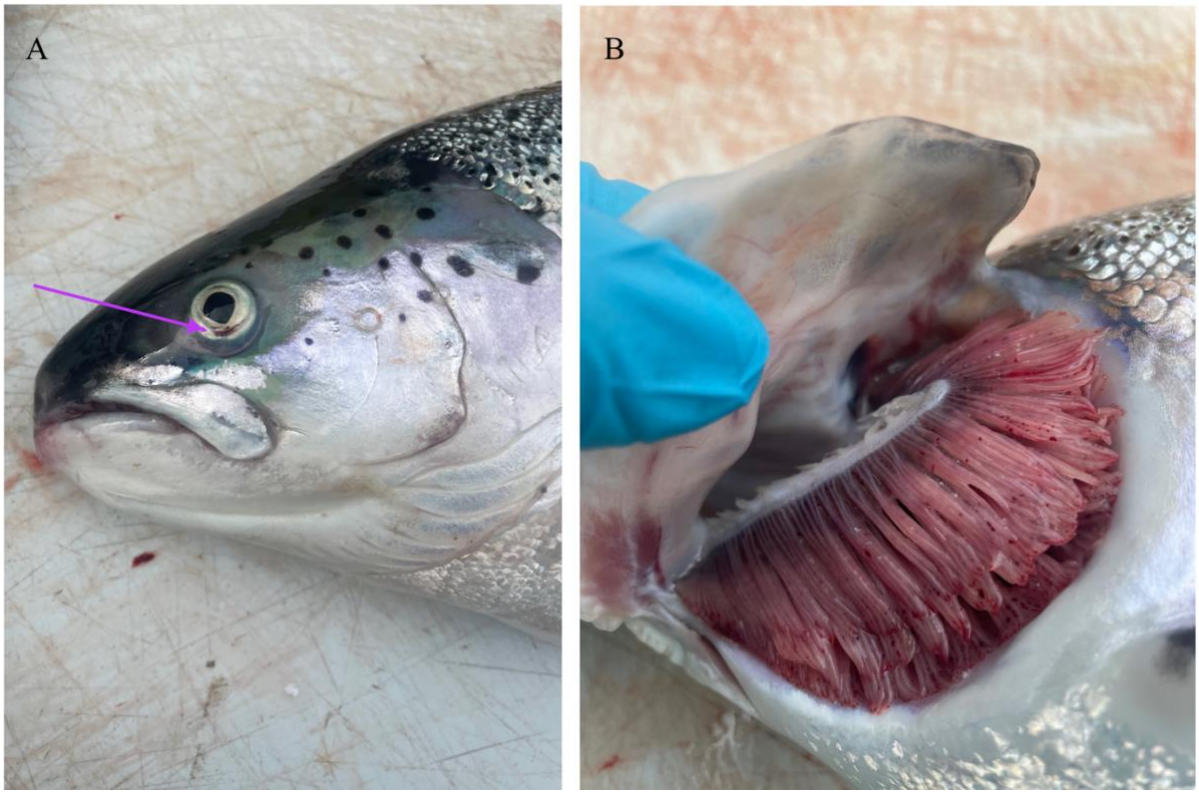


Figur 3.2 Visualisering av 16S PCR-produkter fra spesifisitetstest 1 %i agarose gel. PCR-markør tilsatt i brønn 1 og 19 viser bånd ved 1000, 750, 600, 300, 150 og 50 bp. I brønn 2-17 er det tilsatt PCR-produkt fra bakterieisolater i tabell 3.2. Nukleinsyrer fra bakterieisolatene har gitt bånd rundt 500 bp., og negativ kontroll i brønn 18 har ikke gitt synlig bånd.

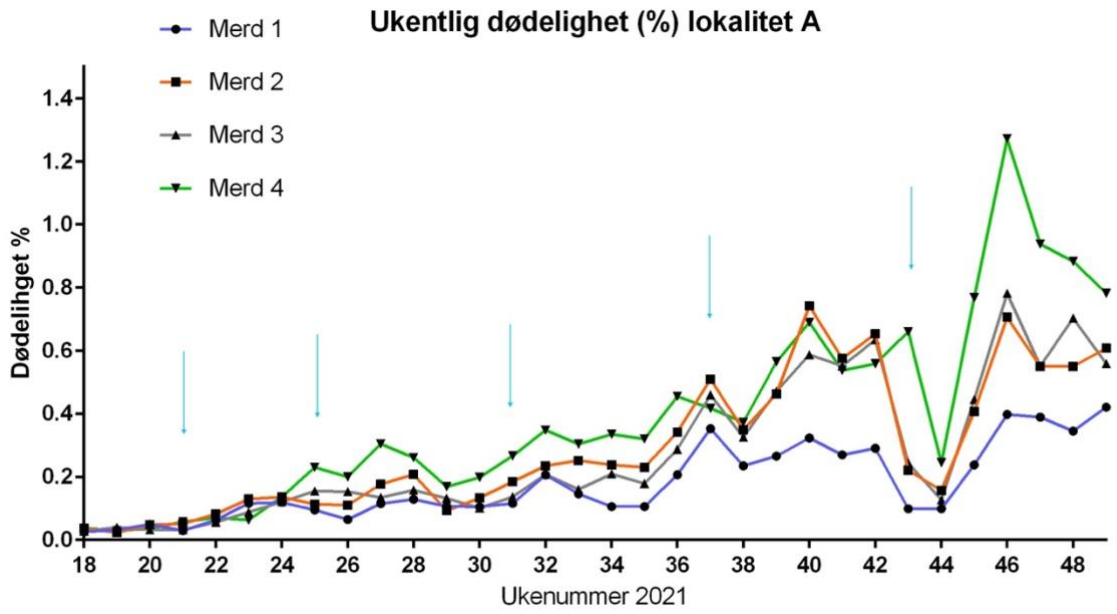
For å verifisere at det var detekterbart DNA i de rensede bakterieisolatene ble det kjørt PCR mot 16S rRNA, og produktet ble visualisert ved hjelp av agarose gelelektroforese (figur 3.2). Brønn 1 og 19 viser bånd ved 1000, 750, 500. 300. 150 og 50 basepar. Tydelige bånd rundt 500 bp i brønnene med PCR-produktet fra bakterieisolatene (2-17). Dette indikerer at det var bakterielt DNA tilstede i prøvene. Det var ikke bånd fra negativ kontroll (brønn 18), som antagelig representerer ubrukte primere og probe.

3.2 Lokalitet A

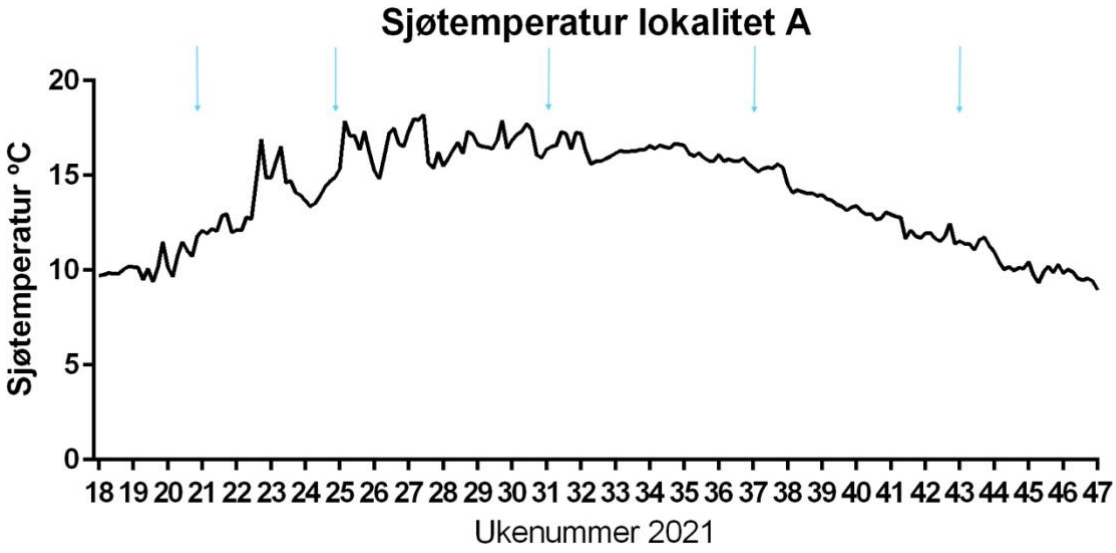
Fisken på lokalitet A ble sjøsatt høsten 2020. Fisken var diagnostisert med CMS og det var tidligere påvist PRV i fisken. På behandlingene i september og oktober var det hovedsakelig stor fin fisk med få eller ingen kliniske tegn, som døde akutt under behandlingene. Beholdningen i de fire merdene som det ble tatt prøver fra var omtrent 50 000 fisk i merd 1, 2, og 3, i merd 4 var det omtrent 100 000 fisk.



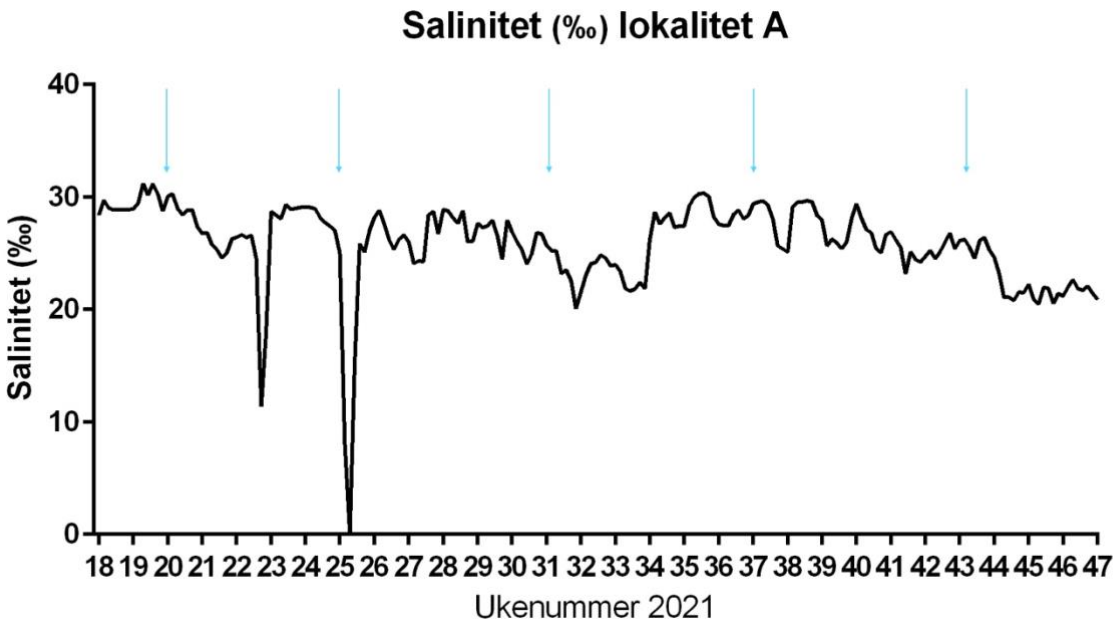
Figur 3.3 Atlantisk laks (svimer) etter behandling i oktober med Optilicer på lokalitet A. Bilde A: øyeblødning (pil). B: punktblødninger på gjellene.



Figur 3.4 Ukentlig dødelighet (%) fra uke 18 til uke 49 i 2021 i de fire merdene som ble fulgt på lokalitet A. Turkise piler viser uker hvor samtlige merder ble behandlet termisk mot lakselus.



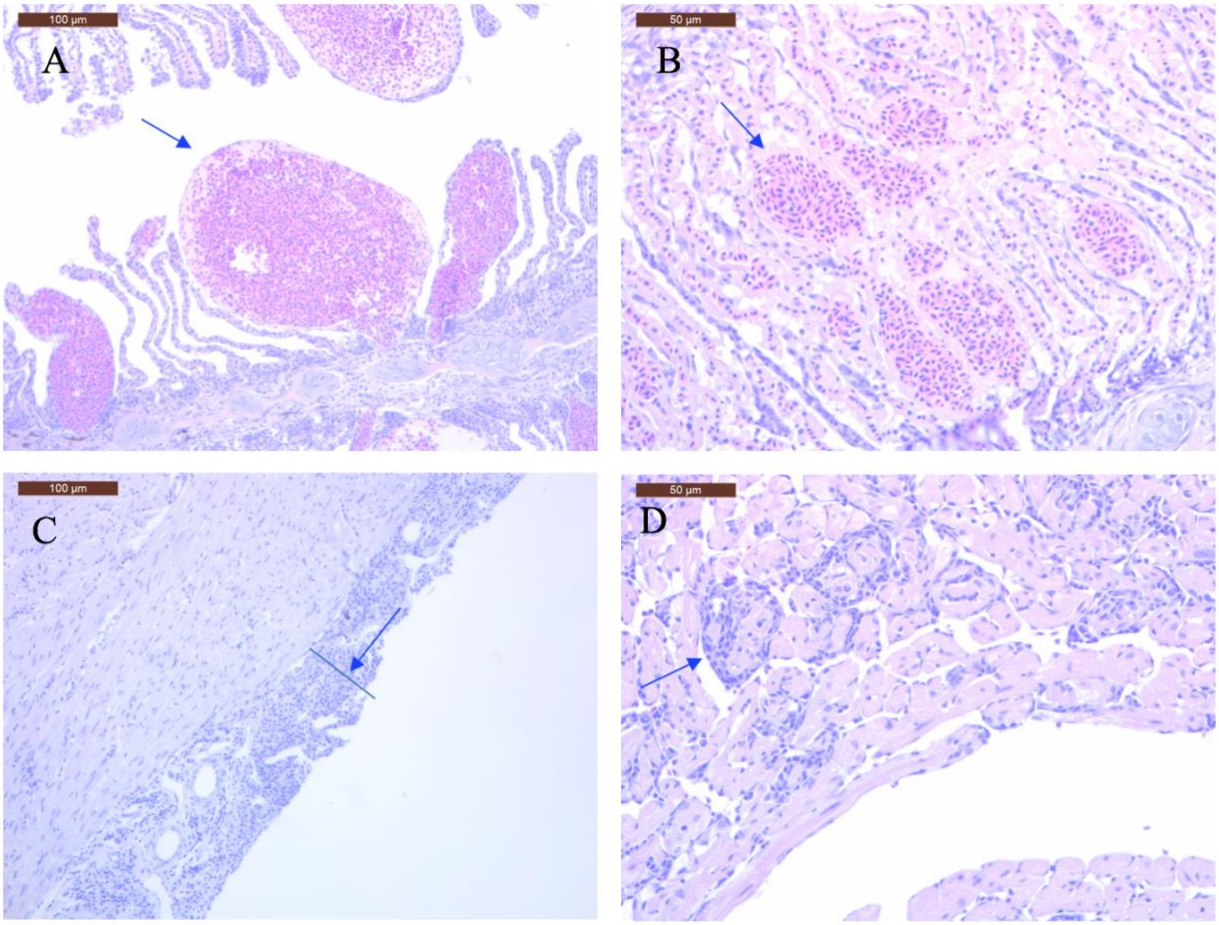
Figur 3.5 Temperaturen i sjøen med daglige registreringer fra uke 18 til uke 49 på lokalitet A. Registreringene er gjort tre meter under vannoverflaten. Turkise piler markerer uker med termisk behandling mot lakselus.



Figur 3.6 Salinitet i sjøen med daglige registreringer fra uke 18 til uke 49 i 2021 på lokalitet A. Registreringene er gjort tre meter under vannoverflaten. Turkise piler markerer uker med termisk behandling mot lakselus.

Histologi

Organpakkene fra tre tilfeldige positive fisk og tre tilfeldige negative fisk ble undersøkt histologisk, med fokus på hjerte, nyre gjeller og pseudobrank. Basert på histologiske observasjoner ble det ikke funnet distinkte vevsendringer som skilte de PCR-positive og de PCR-negative fiskene. På gjellene ble det observert tromber (figur 3.7 A), fortykkelse av lamellespisser («clubbing»), løsning av epitelceller fra basalmembranen på lamellene («lifting»), hyperplasi og hypertrofi av epitelceller. 4/6 pseudobranker hadde blødninger som vist i figur 3.7. I hjertene var det varierende grad av infiltrasjon av betenelsesceller i spongiosum (figur 3.7 D) i ventrikkelen og atrium, i tillegg til epikarditt (figur 3.7 C).



Figur 3.7 Histologiske undersøkelse av fisk fra lokalitet A. Bilde A viser aneurisme (pil) i sekundærlamell. B viser blødning (pil) i pseudobrank. C viser epikarditt, D viser uttalt infiltrasjon av betennelsesceller i spongiosum i ventrikkel.

Termisk behandling - august

Lokalitet A hadde mistanke om pasteurellose ved avlusningen i august, hvor det ble tatt vannprøver. Disse prøvene ble sendt til Veterinærinstituttet på Ås for videre analyse. Prøvene ankom tre dager etter prøvetaking. Det ble ikke påvist *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* i vannprøver tatt fra overflaten i merdene. Vannprøvene fra behandlingskammeret var negative, med unntak av den siste vannprøven som var hentet etter endt behandling av alle merdene, som hadde en Ct-verdi på 35,74.

Termisk behandling - september

I september ble fire merder (merd 1-4) behandlet mot lakselus med termisk avlusning. Under behandlingen ble det tatt vannprøver, vevsprøver til histologi og real time PCR, i tillegg til inokulering fra nyre på blodagar med 2 % NaCl. Fisken hadde en snittvekt på rundt 4,3 kg, og mistanken om pasteurellose var nå bekreftet. Det ble benyttet Optilicer med 34 °C og holdetiden

var omtrent 30 sekunder. Sjøtemperaturen og saliniteten på behandlingsdagen var henholdsvis 11,4 °C og 30,7 ‰ ved tre meters dybde.

Samtlige fisk hadde øyeblødning (figur 3.1 A), og én eller flere splittede finner, og 7/20 (35 %) hadde snutesår. Ved obduksjon kunne en se tegn forenelig med CMS hos noen av fiskene, 6/20 fisk hadde koagulert blod i hjertehulen, 4/20 fisk hadde ascites, og 3/20 hadde sprukket atrium. 6/20 laks hadde væske i svømmeblæren, og 3/20 hadde rosafarget svømmeblære.

Det ble ikke identifisert vekst forenelig med *Pasteurella* sp. på blodagar 2 % salt sådd ut fra hodenyre fra uttaket i september. Derimot var det vekst av beta-hemolytisk grå-hvite runde kolonier med diameter på 1-2 mm fra 6/20 fisk. Disse ble ikke identifisert ved hjelp av MALDI-TOF. Videre undersøkelser viste at isolatet var oksidase negativ, OF positiv, gram-variabel stavformede bakterier. Fra 16S rRNA sekvensering viser isolatet 73 % likhet med *Lactobacillus* sp. i BLAST. I tillegg var det vekst av *V. alginolyticus*, identifisert med MALDI-TOF.

Real time PCR-analyse av hjerte- og nyrevev viste at 3/20 fisk hadde positivt hjertetvev, og 3/20 fisk hadde positivt nyrevev for *P. atlantica* gv. *salmonicida* (tabell 3.3). Dette var tilsammen seks individuelle fisk som hadde positivt vev for *P.atlantica* gv. *salmonicida*, to fisk fra merd 1, to fra merd 2, én hver fra merd 3 og 4, som utgjør en prevalens på 30 % i denne fiskepopulasjonen. De positive analysene hadde høye Ct-verdier (31,14-36,07), noe som indikerer lavt innhold av DNA fra målbakterien i prøvene.

Tabell 3.3 Påvisning av Pasteurella atlantica med høye Ct-verdier og lav prevalens fra lokalitet A i september. Analyse viste gjennomsnittlig Ct-verdi og spekteret («range») for de positive Ct-verdiene i tillegg til prevalens. Analyserte vevsprøver fra hjerte (Hj) og nyre (Ny) fra 20 individer.

	Ct-verdi		
	Gj. Snitt	**Range**	**Prevalens**
Pasteurella atlantica gv. *salmonicida* (Hj)	35,56±0,64	34,84-36,07	3/20
Pasteurella atlantica gv. *salmonicida* (Ny)	33,26±1,98	31,14-35,05	3/20

Analysene av vannprøvene tatt fra behandlingskammeret før oppstart av behandlingen var positive (Ct-verdi 30,30) for *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Innholdet av nukleinsyrer i vannprøven på 500 ml tatt i behandlingskammeret før oppstart var 193,5 ng/µl, som er mye høyere enn det vannet fra merdene inneholdt (19,0-81,3 ng/µl) (tabell 3.4). Prøvene samlet fra behandlingsvannet etter at merd 1, 2, 3 og 4 var behandlet viste lavere Ct-verdier enn før

oppstart (tabell 3.4). Vannprøvene tatt fra overflatevannet i merdene før trenging var negative. Fra merd 3 var én vannprøve positiv, denne var tatt under trenging. Resten av vannprøvene tatt under trenging fra merd 1-4 var negative. Vannprøvene tatt av overflatevannet etter behandling av fisken i de aktuelle merdene var negative for *P. atlantica* gv. *salmonicida*, men viste et høyere innhold av nukleinsyrer sammenlignet med vannprøvene tatt fra merdene før og under behandlingen.

Tabell 3.4 Oversikt over vannprøvene tatt under avlusning på lokalitet A i september 2021. Tabellen viser prøvetakingssted, volum filtrert vann, pumpehastighet (ml/min), mengde nukleinsyrer etter rensing av DNA (µg/µl), Ct-verdi for P. atlantica og beregnet Ct-verdi for 500 ml.

Prøvetakingssted	Når	Volum filtrert (ml)	Pumpehastighet (ml/min)	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi	Beregnet Ct-verdi (500 ml)
Optilicer	Før behandling	500	180	193,5	30,30	30,30
Merd 1	Før trenging	500	180	36,9	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Før trenging	500	180	33,0	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Trenging	500	180	75,2	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Trenging	500	180	45,4	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Etter behandling	500	180	446,4	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 1	50	180	1074,8	28,91	25,59
Merd 2	Før trenging	500	180	29,9	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 2	Før trenging	500	180	30,9	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 2	Trenging	500	180	64,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 2	Trenging	500	180	58,7	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 2	Etter behandling	500	180	362,2	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 2	40	180	766,1	29,51	25,87
Merd 3	Før trenging	500	180	25,6	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 3	Før trenging	500	180	25,8	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 3	Trenging	500	180	48,5	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 3	Trenging	500	180	26,5	37,60	37,60
Merd 3	Etter behandling	330	180	444,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 3	50	180	958,7	29,12	25,8
Merd 4	Før trenging	500	180	19,0	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 4	Før trenging	500	180	27,8	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 4	Trenging	500	180	66,0	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 4	Trenging	500	180	81,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 4	Etter behandling	500	180	120,9	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 4	30	180	1269,9	28,97	24,91

Termisk behandling – oktober

I oktober 2021 ble merd 1, 2 og 3 behandlet med Optilicer i den rekkefølgen, ved behandlingstemperatur 34 °C, og holdetid omtrent 30 sekunder. Under behandlingen ble det tatt vannprøver, vevsprøver fra fisk til histologi, vevsbiter fra hjerte og nyre til real time PCR analyse, og svaber fra gjeller og noen fra hud. På behandlingsdagen var sjøtemperaturen 11,4 °C og saliniteten var 26,2 ‰ ved tre meters dybde.

Avlesning av bakterieskålene viste ingen vekst forenelig med *Pasteurella* sp. Bakterieutstryk fra 2/14 fisk hadde vekst av *V. splendidus*, bekreftet ved hjelp av MALDI-TOF.

Analyse med real time PCR av hjertevevet var negative hos alle individer (14), 3/14 fisk, én i hver merd, hadde positivt nyrevev for *P. atlantica* gv. *salmonicida*, med høye Ct-verdier (tabell 3.5). 12/14 (86 %) gjellesvaber var positive, og 3/4 (75 %) hudsvaber var positive for bakteriens DNA.

Tabell 3.5 Påvisning av Pasteurella atlantica gv. salmonicida med høye Ct-verdier og lav prevalens fra lokalitet A i oktober. Viser gjennomsnittlig Ct-verdi og rangen for de positive Ct-verdiene i tillegg til prevalens. Analyserte vevsprøver fra hjerte (Hj) og nyre (Ny) fra 14 individer, svaberprøver fra hud (Hu) og gjeller (Gj).

	Ct-verdi		
	Gj. Snitt	**Range**	**Prevalens**
Pasteurella atlantica (Hj)	-	-	0/14
Pasteurella atlantica (Ny)	37,75±1,56	36,0-38,98	3/14
Pasteurella atlantica (Hu)	34,34±1,54	32,58-35,44	3/4
Pasteurella atlantica (Gj)	34,83±1,94	32,26-38,81	12/14

Etter filtrering og analyse av miljø-DNA-prøvene viste resultatene at alle prøvene tatt av behandlingsvannet i avlusningsenheten var positive (tabell 3.6). Prøven tatt før oppstart har 25,99 i Ct-verdi og en nukleinsyrekonsentrasjon på 215,6 ng/µl, som er mye høyere enn nukleinsyreinnholdet vannprøvene tatt fra overflaten i merdene. Etter merd 1 var behandlet gikk Ct-verdien beregnet for 500 ml ned til 23,47 som kan indikere tilstedeværelse av mer *Pasteurella*-bakterier enn før oppstart av behandlingen. Ct-verdien for vannet tatt etter merd 2 var behandlet var 23,78, som indikerer nokså lik mengde av bakteriens DNA i vannet som prøven tatt etter merd 1. Etter behandling av merd 3 viser analyse av behandlingsvannet Ct-verdi 22,25, som kan indikere en oppkonsentrering av bakterien i vannet i behandlingskammeret.

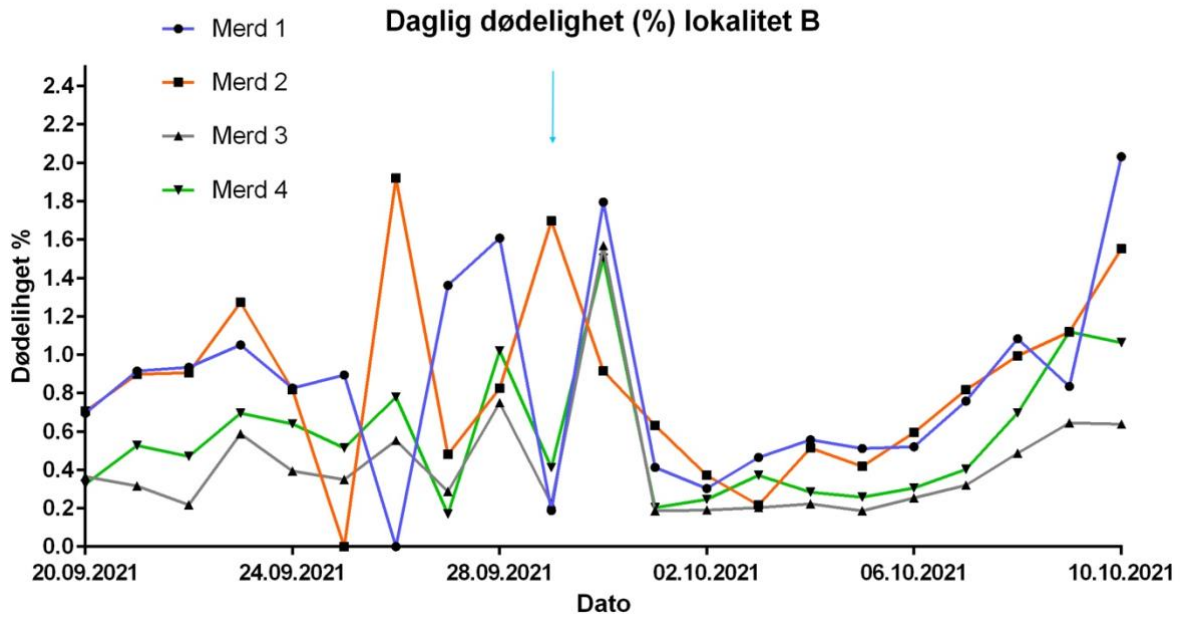
Fra overflatevannet tatt i merd 1 og 2 så var en av to vannprøver tatt før trenging positiv, og begge vannprøvene tatt under trenging positiv. I merd 3 var det ikke positive vannprøver tatt før trenging av fisken, mens begge vannprøvene tatt under trengingen var positive med Ct-verdiene 38,34 og 32,32. Miljø-DNA-prøvene tatt fra overflatevannet som fisken føres tilbake i merdene var positive for bakterien i alle tre merdene.

Tabell 3.6. Oversikt over vannprøvene tatt under avlusning på lokalitet A i oktober 2021. Viser prøvetakingssted, volum filtrert vann, pumpehastighet (ml/min), mengde nukleinsyrer etter rensing av DNA (µg/µl), Ct-verdi og utregnet Ct-verdi for 500 ml.

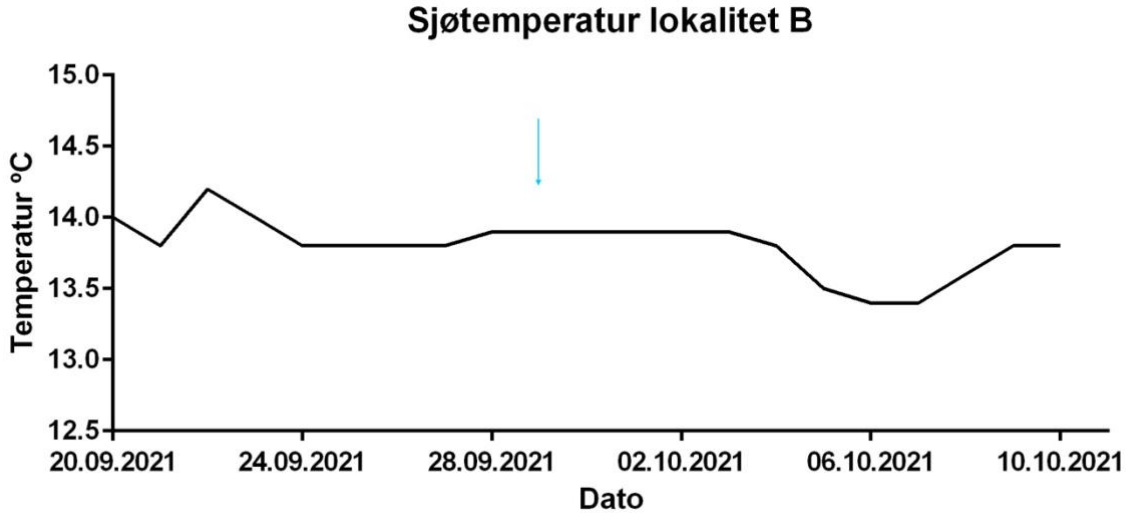
Prøvetakingssted	Når	Volum filtrert (ml)	Pumpehastighet (ml/min)	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi	Beregnet Ct-verdi (500 ml)
Optilicer	Før behandling	500	722	215,6	25,99	25,99
Merd 1	Før trenging	500	722	32,9	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Før trenging	500	722	32,7	34,40	34,40
Merd 1	Trenging	500	722	40,2	30,51	30,51
Merd 1	Trenging	500	722	59,3	32,41	32,41
Merd 1	Etter behandling	500	722	357,0	38,86	38,86
Optilicer	Etter merd 1	72	722	470,8	26,31	23,47
Merd 2	Før trenging	500	722	26,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 2	Før trenging	500	722	28,0	35,36	35,36
Merd 2	Trenging	500	722	69,1	30,59	30,59
Merd 2	Trenging	500	722	75,6	32,03	32,03
Merd 2	Etter behandling	350	722	419,6	31,22	30,71
Optilicer	Etter merd 2	60	722	864,9	26,84	23,78
Merd 3	Før trenging	500	722	32,7	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 3	Før trenging	500	722	38,5	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 3	Trenging	500	722	51,4	38,34	38,34
Merd 3	Trenging	500	722	16,5	32,32	32,32
Merd 3	Etter behandling	400	722	234,4	30,36	30,04
Optilicer	Etter merd 3	60	722	784	25,31	22,25

3.3 Lokalitet B

Lokalitet B består av syv merder med atlantisk laks som ble sjøsatt i august og september 2021. Merd 1 og 4 inneholdt omtrent 55 000 laks, merd 2 inneholdt omtrent 27 000 laks og merd 4 bestod av omtrent 44 000 laks. Fisken var diagnostisert med pasteurellose, og det var også mistanke om CMS på behandlingstidspunktet. På behandlingsdagen var gjennomsnittsvekt 4,99 kg. Det ble nyttet Optilicer med vanntemperatur på 34 °C, og holdetid var omtrent 30 sekunder. Sjøtemperatur og salinitet på behandlingsdagen var 11,3 °C og 30,7 ‰ på tre meters dybde.



Figur 3.8 Daglig dødelighet (%) i de aktuelle merdene en periode før og etter behandlingen. Turkis pil viser dødeligheten på behandlingsdagen.



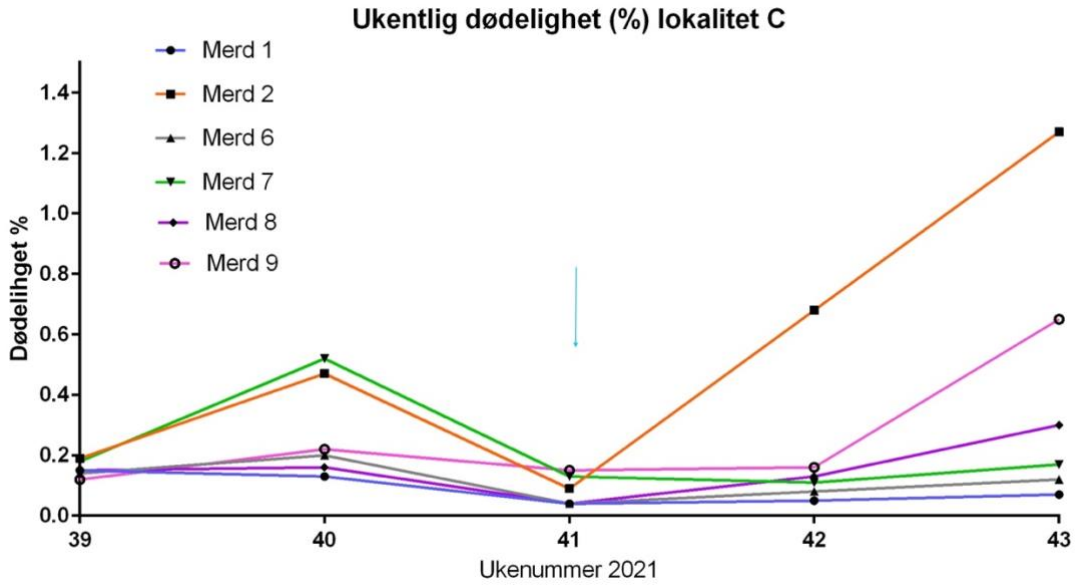
Figur 3.9 Temperatur i sjøen med daglige registreringer ved tre meters dybde på lokalitet B. Turkis pil viser temperatur på behandlingsdagen.

Det ble påvist DNA fra *P. atlantica* gv. *salmonicida* i miljø-DNA prøvene tatt av vannet i merdene før trenging, under trenging, og etter behandling (tabell 3.5). Det ble også påvist i behandlingskammeret i Optiliceren, både før oppstart av behandlingen og etter hver merd som ble behandlet. NanoDrop resultater fra ekstrahert DNA fra behandlingsvannet før oppstart av behandlingen viser 178,0 ng/µl, og resulterte i en Ct-verdi på 28,53. Dette er mer enn dobbelt så mye DNA som var i vannprøvene tatt fra overflaten før trenging i merdene 1-4, som var 42,1-84,4 ng/µl. Etter behandling av merd 1 er Ct-verdien (beregnet for 500 ml) 14,28 (tabell 3.5). Dette indikerer at det oppkonsentreres mye bakterier i vannet i behandlingskammeret ettersom fisken behandles gjennom. Etter analyse av vannprøvene fra behandlingskammeret fra merd 2 til og med merd 4 ser det ut til at mengde bakterier stabiliserer seg, disse prøvene har en Ct-verdi 16,06-17,24.

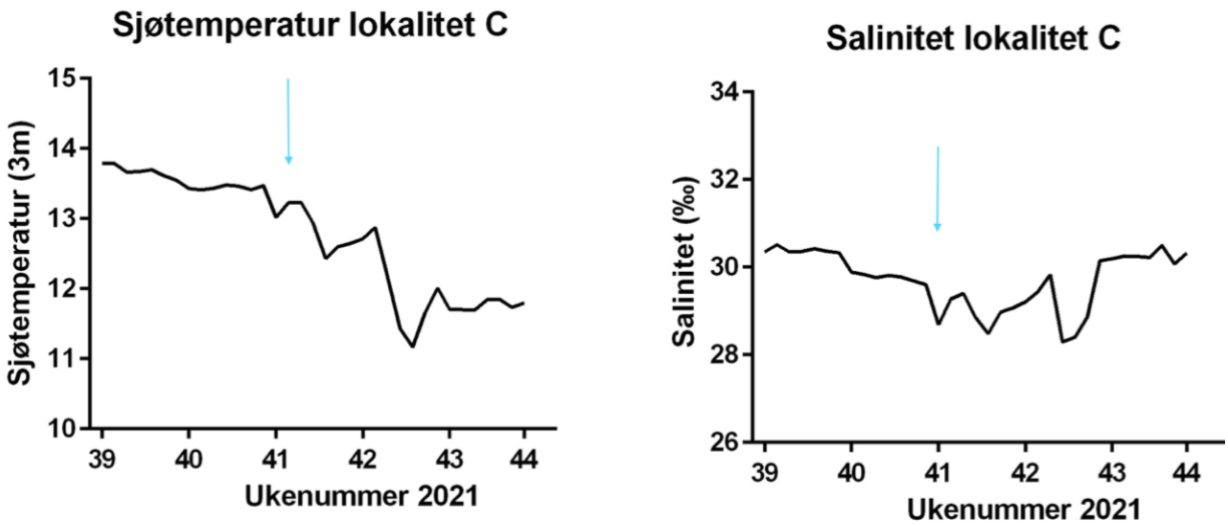
Tabell 3.7 Oversikt over vannprøvene tatt under termisk avlusning på lokalitet B. Viser prøvetakingssted, volum filtrert vann, pumpehastighet (ml/min), mengde nukleinsyrer etter rensing av DNA (µg/µl), Ct-verdi og utregnet Ct-verdi for 500 ml.

Prøvetakingssted	Når	Volum filtrert (ml)	Pumpehastighet (ml/min)	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi	Beregnet Ct-verdi (500 ml)
Optilicer	Før oppstart	500	190	178,0	28,53	28,53
Merd 1	Før trenging	500	190	65,0	29,00	29,00
Merd 1	Før trenging	500	190	59,0	30,25	30,25
Merd 1	Trenging	500	190	74,6	27,64	27,64
Merd 1	Trenging	500	190	83,3	28,55	28,55
Merd 1	Etter behandling	500	190	134,8	24,46	24,46
Optilicer	Etter merd 1	50	190	579,4	17,60	14,28
Merd 2	Før trenging	500	190	42,1	31,45	32,45
Merd 2	Før trenging	500	190	43,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 2	Trenging	500	190	38,2	27,70	27,70
Merd 2	Trenging	500	190	85,8	26,70	26,70
Merd 2	Etter behandling	140	190	241,1	32,57	32,57
Optilicer	Etter merd 2	40	190	659,9	20,50	16,86
Merd 3	Før trenging	500	190	64,8	31,80	31,80
Merd 3	Før trenging	500	190	63,5	27,39	27,39
Merd 3	Trenging	500	190	67,3	28,07	28,07
Merd 3	Trenging	500	190	65,0	26,86	26,86
Merd 3	Etter behandling	250	190	448,0	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 3	40	190	512,9	20,88	17,24
Merd 4	Før trenging	500	190	63,7	31,76	31,76
Merd 4	Før trenging	500	190	84,4	31,71	31,71
Merd 4	Trenging	500	190	132,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 4	Trenging	500	190	119,6	34,36	34,36
Merd 4	Etter behandling	100	190	467,5	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 4	50	190	703,3	19,38	16,06

3.4 Lokalitet C



Figur 3.10 Ukentlig dødelighet (%) i de aktuelle merdene på lokalitet C to uker før behandlingen, og to uker etter behandling. Turkis pil viser dødelighet i uken hvor den termiske behandlingen ble gjennomført.



Figur 3.11 Sjøtemperatur (°C) og salinitet (‰) på lokalitet C med daglige registreringer ved tre meters dybde. Turkis pil markerer sjøtemperatur og salinitet ved behandlingen.

Lokalitet C består av 10 merder med atlantisk laks. Det ble tatt vannprøver fra merd 1, og 6 første dagen, merd 7 og 8 andre dagen og merd 9 og 2 tredje dagen. Det var gjennomsnittlig 96 500 laks i hver av de aktuelle merdene. I de to ukene før behandling var ukentlig gjennomsnittlig dødelighet 0,22 % i de aktuelle merdene (figur 3.11). Fisken på lokaliteten var diagnostisert med pasteurellose, CMS, PD, og miljørelaterte gjelleskader, i tillegg var det påvist PRV. På behandlingsdagene var sjøtemperaturen 13,2±0,1 °C og saliniteten 29,12±0,39 ‰ på tre meters dybde (figur 3.11). I de to ukene etter behandlingen var den ukentlige dødeligheten 0,32 % i snitt for de behandlede merdene.

Analyseresultatene av miljø-DNA-prøvene samlet under behandling på lokalitet C er presentert i tabell 3.8. Vannprøven fra behandlingskammeret før oppstart har et høyt nukleinsyreinnhold (495,0 ng/µl), og en *Pasteurella*-Ct-verdi på 28,30. Ct-verdien for vannet tatt behandlingskammeret etter merd 1 og 6 var henholdsvis 24,22 og 24,99 (Ct-verdi beregnet for 500 ml). Etter behandling av merd 7 ble Ct-verdien videre redusert til 22,36. Dette indikerer en økning av *P. atlantica* gv. *salmonicida* i behandlingsvannet. Videre viser analyse av miljø-DNA-prøven samlet i behandlingskammeret etter merd 8 og 9 Ct-verdien 24,55, noe som kan indikere en reduksjon av bakterien i behandlingsvannet. Etter behandling av den siste merden (2) viser analyse av vannprøven en Ct-verdi på 19,53 (beregnet for 500 ml) som igjen kan indikere en økning av bakteriene i behandlingsvannet. I overflatevannet samlet i merd 1, 8 og 9 er det ikke påvist DNA fra *Pasteurella*. I merd 6 var prøven samlet inn fra overflatevannet under trenging av fisken positiv (Ct-verdi 32,97). Prøvene fra overflatevannet i merd 7 og 2 før og under trenging var positive for *Pasteurella* med Ct-verdier mellom 32,77 og 39,12.

Tabell 3.8 Oversikt over vannprøvene tatt under termisk avlusning på lokalitet C. Viser prøvetakingssted, volum filtrert vann, pumpehastighet (ml/min), konsentrasjon av nukleinsyrer etter rensing av DNA (µg/µl), Ct-verdi og utregnet Ct-verdi for 500 ml.

Prøvetakingssted	Når	Volum filtrert (ml)	Pumpehastighet (ml/min)	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi	Beregnet Ct-verdi (500 ml)
Optilicer	Før oppstart	500	190	495,0	28,30	28,30
Merd 1	Før trenging	500	190	44,5	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Trenging	500	190	34,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 1	Etter behandling	500	190	44,7	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 1	30	190	943,3	28,28	24,22
Merd 6	Før trenging	500	190	38,8	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 6	Trenging	500	190	43,8	32,97	32,97
Optilicer	Etter merd 6	30	190	562,3	29,05	24,99
Merd 7	Før trenging	500	190	30,6	37,44	37,44
Merd 7	Trenging	500	190	48,8	33,40	33,40
Optilicer	Etter merd 7	50	190	1011,7	25,68	22,36
Merd 8	Før trenging	500	190	67,9	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 8	Trenging	500	190	381,1	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 9	Før trenging	500	190	66,5	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Merd 9	Trenging	500	190	95,3	Ingen-Ct	Ingen-Ct
Optilicer	Etter merd 9	50	190	701,8	27,87	24,55
Merd 2	Før trenging	500	190	33,6	32,77	32,77
Merd 2	Trenging	500	190	36,9	39,12	39,12
Optilicer	Etter merd 2	50	190	844,7	22,85	19,53

3.5 Validering av filtrering og lagring av miljø-DNA-prøver

3.5.1 Pumpehastighet

Bakteriebuljongen til dette forsøket vokste i romtemperatur i 40 timer og OD ble målt til 0,145. Registrerte antall kolonier som vokste fra de ulike fortynningene er vist i tabell 3.9. På agarskålene dyrket med de minst fortynnede fortynningene vokste bakteriekoloniene over hverandre, og det var så høyt antall at de ikke var mulig å telle. Agarskålene med $1{:}10^4$ og $1{:}10^5$ fortynningene inneholdt henholdsvis 400 og 9 kolonier, noe som gir en CFU/ml på $4{,}0x10^6$ og $9{,}0x10^5$. Dette er noe unøyaktig, men gir et gjennomsnitt på $2{,}45\ x10^6$ CFU/ml. De resterende agarskålene med de mer fortynnede fortynningene ble det ikke registrert vekst på.

Tabell 3.9 Kolonivekst etter utsåing av fortynninger av bakteriekultur med P. atlantica gv. salmonicida på blodagar med 2 % NaCl. Viser fortynning, antall kolonier som vokste, og utregnet CFU/ml.

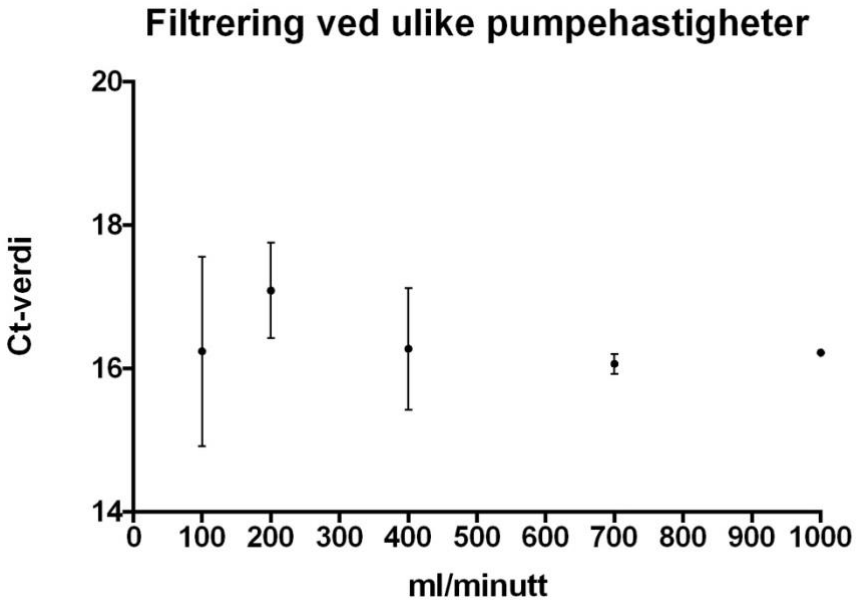
Fortynning	$1{:}10^2$	$1{:}10^3$	$1{:}10^4$	$1{:}10^5$	$1{:}10^6$	$1{:}10^7$
Antall kolonier	Utallig	Utallig	400	9	Ingen vekst	Ingen vekst
CFU/ml			$4{,}0\ x\ 10^7$	$9{,}0x10^6$		

Tabell 3.10 viser resultatet etter filtrering og analyse av sjøvannet filtrert ved de ulike pumpehastighetene med den peristaltiske pumpen. I sjøvannet som ikke var tilsatt *P. atlantica* er det ikke påvist DNA fra bakterien. Sjøvannet tilsatt bakteriekultur har prøvene positive analyser med Ct-verdier mellom 15,31 og 17,56.

Tabell 3.10 Oversikt over sjøvannet med tilsatt P. atlantica gv. salmonicida-bakteriekultur som ble filtrert med ulike pumpehastigheter. Viser mengde tilsatt bakteriekultur, volum sjøvann, pumpehastighet (ml/min), nukleinsyreinnhold etter rensing av DNA og Ct-verdi etter analyse med real time PCR.

Replikat	**Tilsatt bakteriekultur (ml)**	**Volum sjøvann (ml)**	**Pumpehastighet (ml/min)**	**Nukleinsyrer (ng/µl)**	**Ct-verdi**
1	0	500	1000	17,5	Ingen-Ct
2	0	500	100	16	Ingen-Ct
1	0,5	500	100	29,9	17,18
2	0,5	500	100	36,9	15,31
1	0,5	500	200	31,7	17,56
2	0,5	500	200	42,2	16,62
1	0,5	500	400	31,3	16,88
2	0,5	500	400	33,8	15,68
1	0,5	500	700	32,3	16,17
2	0,5	500	700	31,2	15,97
1	0,5	500	1000	33,4	16,25
2	0,5	500	1000	27,9	16,2

I figur 3.12 kan en se at standardavviket til de to replikatene var høyere ved de lavere pumpehastighetene (100, 200, 400 ml/min), sammenlignet med standardavviket ved de høyeste pumpehastighetene (700 og 1000 ml/min). Høyeste gjennomsnittlig Ct-verdi var for sjøvannet filtrert med 200 ml/min. Sjøvannet filtrert med 700 ml/min hadde laveste gjennomsnittlige Ct-verdi, og lavt standardavvik.



Figur 3.12 Ct-verdier etter real time PCR analyse mot P. atlantica gv. salmonicida til de to replikatene filtrert med ulike pumpehastigheter. Viser gjennomsnittsnitt (•) og standardavvik.

3.5.2 Effekt av lagring over tid ved 4 °C og 22 °C på deteksjon

Forsøk 1

Bakteriekultur ble dyrket i buljong i 40 timer, og OD ble målt til 0,188 i spektrofotometeret. Etter fem dager inkubasjon ble agarskålene avlest, og på $1:10^4$ fortynningen ble det telt 211 kolonier, og på $1:10^5$ fortynningen hadde det vokst 3 kolonier (tabell 3.11). Agarskålene som inneholdt høyere fortynninger hadde ingen vekst, og på agarskålene som inneholdt mindre fortynnet bakteriekultur var det «teppevekst» av kolonier.

Tabell 3.11 Kolonivekst etter utsåing av fortynninger av bakteriekultur med P. atlantica gv. salmonicida på blodagar med 2 % NaCl. Viser fortynning, antall kolonier som vokste, og utregnet CFU/ml.

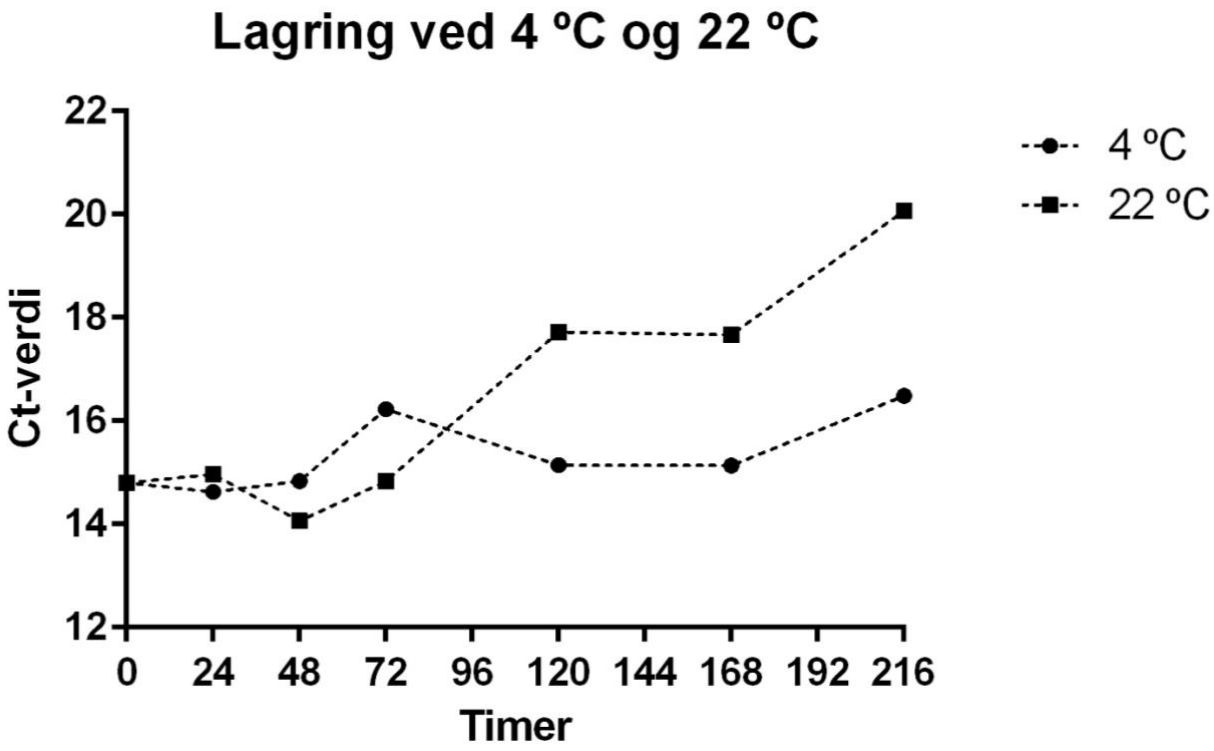
Fortynning	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$	$1:10^7$
Antall kolonier	Utallig	211	3	Ingen vekst	Ingen vekst
CFU/ml		$2{,}11 \times 10^7$	3×10^6		

Sjøvannet uten tilsatt bakterier var negative etter analyse med real time PCR (tabell 3.12). I de resterende flaskene med sjøvann med 500 ml sjøvann ble det tilsatt 500 µl av bakteriekulturen. Resultatene etter filtrering og analyse viser at konsentrasjon av nukleinsyrer økte raskt i sjøvannet som var lagret ved 22 °C, før det ble gradvis redusert etter 48 timer. I sjøvannet lagret ved 4 °C gikk nukleinsyremengden noe langsommere opp frem til det var lagret i 120 timer hvor det så ble redusert igjen.

Tabell 3.12 Oversikt over sjøvannet med P. atlantica gv. salmonicida-bakteriekultur lagret i 0, 1, 2, 3, 5, 7 og 9 dager ved 4 ºC og 22 ºC. Visert volum sjøvann, volum tilsatt bakteriekultur, lagringstid, pumpehastighet, lagringstemperatur, nukleinsyreinnhold etter rensing av DNA og Ct-verdi etter analyse med real time PCR.

Sjøvann (ml)	Tilsatt bakteriekultur (µl)	Lagringstid (timer)	Pumpehastighet (ml/min)	Lagrings-temperatur (°C)	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi
500	0	0	700	-	20,4	Ingen-Ct
500	0	0	700	-	21,3	Ingen-Ct
500	500	0	700	-	38,7	15,2
500	500	0	700	-	35,9	14,4
500	500	24	700	4	113,6	14,63
500	500	24	700	22	2068,6	14,97
500	500	48	700	4	473,2	14,84
500	500	48	700	22	1597,1	14,06
500	500	72	700	4	1602	16,23
500	500	72	700	22	124,4	14,84
500	500	120	700	4	1656,1	15,15
500	500	120	700	22	276,8	17,72
500	500	168	700	4	1544,3	15,14
500	500	168	700	22	226,1	17,67
500	500	216	700	4	1036,9	16,49
500	500	216	700	22	127,2	20,07

I tabell 3.12 og figur 3.13 kan en se at i prøvene lagret ved 4 °C var det noe variasjoner i Ct-verdiene, men de var generelt stabil i perioden de ble lagret. For sjøvannet lagret ved 22°C var Ct-verdien nokså stabil frem til 72 timer etter tilsetning av bakteriene. Deretter kan en se en økning av Ct-verdien frem mot siste filtreringstidspunkt etter 216 timer (figur 3.13), noe som igjen indikerer en nedgang i mengde *Pasteurella*-DNA i vannet.



Figur 3.13 Vannprøver lagret ved 4 ºC (•) og 22 ºC (firkant) filtrert etter 0, 24, 48, 72, 120. 168 og 216 timer, analysert mot P. atlantica gv. salmonicida med real time PCR.

Forsøk 2

Det samme ble repetert for en bakteriekultur med lavere innhold av bakterier. Til dette forsøkte vokste bakteriekulturen i buljongen i 20 timer ved romtemperatur, og OD ble målt til 0,002 i spektrofotometeret. Det ble så tilsatt 30 µl av bakteriekulturen til sjøvannet hentet fra Puddefjorden i Bergen. Antall bakteriekolonier som vokste fra fortynningsrekken fra bakteriebuljongen på blodagar m/salt ble talt etter 6 dager, og er presentert i tabell 3.13. Fra 1:100 fortynningen ble CFU/ml beregnet til $2{,}58 \times 10^6$, mens den ble beregnet til $2{,}2 \times 10^5$ for 1:1000 fortynningen.

Tabell 3.13 Kolonivekst etter utsåing av fortynninger av bakteriekultur med P. atlantica gv. salmonicida på blodagar med 2 % NaCl. Viser fortynning, antall kolonier som vokste, og utregnet CFU/ml.

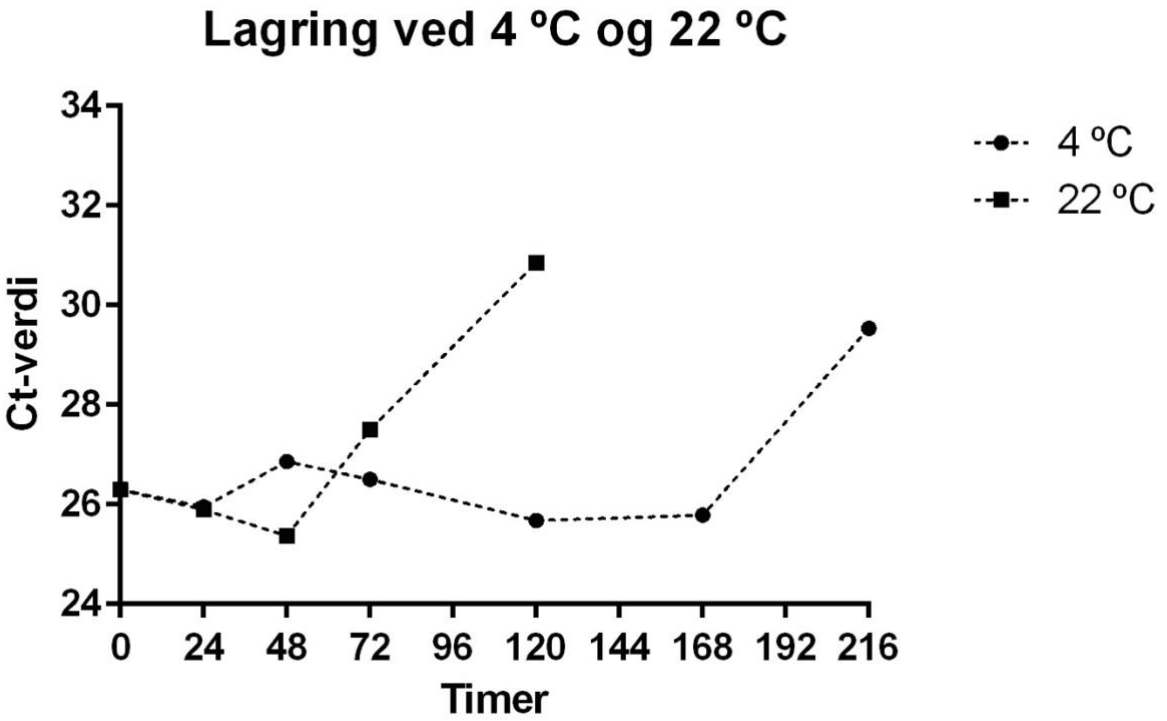
Fortynning	1:10	$1{:}10^2$	$1{:}10^3$	$1{:}10^4$	$1{:}10^5$
Antall kolonier	Utallig	2584	22	Ingen vekst	Ingen vekst
CFU/ml		$2{,}58 \times 10^6$	$2{,}2 \times 10^5$		

Resultatene for forsøk 2 er presentert i tabell 3.14. Sjøvannet uten tilsatt bakteriekultur var negative for *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Sjøvannet som ble filtrert direkte etter tilsetting av 30 µl hadde en nukleinsyrekonsentrasjon på 32,2 og 33,3 ng/ µl etter rensing av DNA. Videre analyse med real time PCR viste at disse vannprøvene hadde henholdsvis 26,18 og 26,43 i Ct-verdi. Nukleinsyremengden i vannet steg under lagring av prøvene. Det maksimale innholdet av nukleinsyrer i de ferdig rensede vannprøvene ble målt i vannet etter 72 timer. Da hadde vannet lagret ved 4 °C 520,9 ng/µl, og vannet lagret ved 22 °C hadde 707,1 ng/µl.

Tabell 3.14 Oversikt over sjøvannet tilsatt P. atlantica gv. salmonicida-bakteriekultur lagret i 0, 1, 2, 3, 5, 7 og 9 dager ved 4 °C og 22 °C. Visert volum sjøvann, volum tilsatt bakteriekultur, lagringstid, pumpehastighet, lagringstemperatur, nukleinsyreinnhold etter rensing av DNA og Ct-verdi etter analyse med real time PCR mot P. atlantica gv. salmonicida.

Sjøvann (ml)	Tilsatt bakteriekultur (µl)	Lagringstid (timer)	Lagrings-temperatur (℃)	Pumpehastighet (ml/min)	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi
500	0	0	-	700	22,5	Ingen-Ct
500	0	0	-	700	21,9	Ingen-Ct
500	30	0	-	700	32,2	26,18
500	30	0	-	700	33,0	26,43
500	30	24	4	700	82,0	25,95
500	30	24	22	700	242,2	25,9
500	30	48	4	700	203,2	26,86
500	30	48	22	700	518,7	25,37
500	30	72	4	700	520,9	26,5
500	30	72	22	700	707,1	27,5
500	30	120	4	700	341,9	25,68
500	30	120	22	700	48,4	30,85
500	30	168	4	700	266,0	25,79
500	30	168	22	700	92,7	Ingen-Ct
500	30	216	4	700	120,8	29,54
500	30	216	22	700	36,8	Ingen-Ct

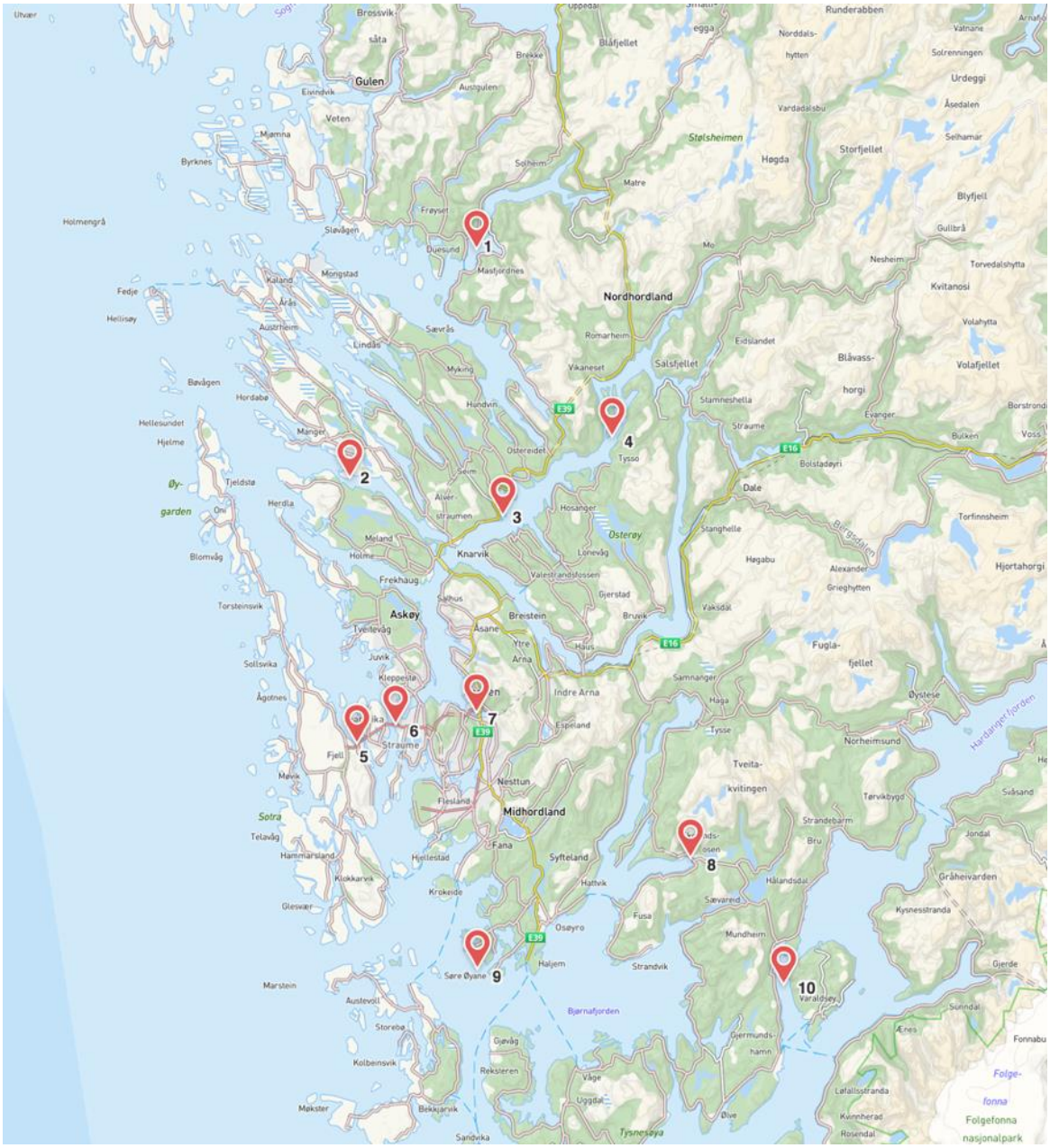
Utviklingen av *Pasteurella*-Ct-verdiene er illustrert i figur 3.14. En kan se at vannet tilsatt *Pasteurella* lagret ved 4°C hadde stabil Ct-verdi frem til dag syv (ca. 26,2), deretter steg Ct-verdien til 29,54. Dette kan indikere en nedgang av bakteriemengden i sjøvannet. For sjøvannet lagret ved 22 °C er Ct-verdien stabil frem til 48 timer etter tilsatt bakteriekultur. Deretter kan en se en økning av Ct-verdien ved 72 timer (27,5) og ved 120 timer (30,85) som kan indikere en nedgang i bakteriemengden. Fra dag 7 og videre var bakterien ikke lenger mulig å påvise i vannet lagret ved 22 °C.



Figur 3.14 Ct-verdiene for sjøvannet tilsatt bakteriekultur med OD 0,002, som ble lagret ved 4 ºC (•) og 22 ºC (firkant) og filtrert etter 0, 24, 72, 120, 168 og 216 timer, analysert mot P. atlantica gv. salmonicida med real time PCR. I prøvene lagret ved 22 ºC mer enn 120 timer ble det ikke detektert P. atlantica gv. salmonicida, derfor er ikke disse verdiene markert i figuren.

3.6 Naturlig forekomst av *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* i PO 3 og 4

Det ble samlet inn én 500 ml vannprøve fra hvert av de tilfeldige stedene rundt Bergen markert i figur 3.15.



Figur 3.15 Kart over område rundt Bergen hvor sjøvannprøver er tatt. Sted er markert med rød pil, og prøvenummer med tall ved siden pil.

Etter prosessering og analyse av prøvene var alle negative for *P. atlantica* gv. *salmonicida,* og innholdet av nukleinsyrer etter rensing av DNA fra vannprøvene var mellom 14,8 og 67,4 ng/µl (tabell 3.15). Etter PCR-analyse mot 16S rRNA, og videre visualisering av nukleinsyrene i agarose gel ble det dannet bånd ved 500 bp fra samtlige prøver. Dette indikerer at det er bakterielt DNA tilstede i prøvene, men ikke fra *P. atlantica* gv. *salmonicida.*

Tabell 3.15 Analyseresultater av nukleinsyrekonsentrasjon (ng/µl) og Ct-verdi til prøver av sjøvann samlet i produksjonsområde 3 og 4 testet mot P. atlantica gv. salmonicida. Etter PCR mot 16S rRNA ble PCR-produktet visualisert i agarosegel, + indikerer at PCR-produktet dannet bånd ved omtrent 500 bp.

Prøvenummer	Nukleinsyrer (ng/µl)	Ct-verdi	Bånd i agarosegel ved 500 bp.
1	42,1	Ingen-Ct	+
2	63,8	Ingen-Ct	+
3	14,8	Ingen-Ct	+
4	44,4	Ingen-Ct	+
5	57,7	Ingen-Ct	+
6	36,4	Ingen-Ct	+
7	22,5	Ingen-Ct	+
8	18,5	Ingen-Ct	+
9	65,0	Ingen-Ct	+
10	67,4	Ingen-Ct	+

4. Diskusjon

Pasteurellose hos atlantisk laks har etablert seg som en bakteriesykdom som truer fiskevelferd og bærekraft i oppdrettsnæringen i Norge. Dette studiet har vist at *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* kan påvises i miljø-DNA-prøver tatt fra merd og behandlingskammer ombord i avlusningsenheter, og kan brukes for å detektere sub-klinisk infeksjon av pasteurellose. Studiet viser også at svaber av hud og gjeller er en mulig metode for å detektere *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Disse ikke-invasive metodene vil muliggjøre påvisning av pasteurellose i populasjoner uten avlivning av fisk og hos populasjoner med infeksjon ved lav prevalens. Metodene kan føre til tidligere påvisning av infeksjonen, og dermed tidlig implementering av sykdomsbekjempende tiltak på anleggene med infisert fisk. I tillegg setter studien spørsmålstegn rundt rengjøringen av utstyret som benyttes til avlusning. Undersøkelse av lagringstid og oppbevaringstemperatur viser at *Pasteurella*-holdige prøver kan oppbevares i romtemperatur frem til filtrering tre dager etter innsamling uten stor grad av degradering og påvirkning på deteksjon. Resultatene indikerer at prøvene bør prosesseres innen syv dager dersom de holdes kjølig, eller innen to dager dersom de oppbevares ved romtemperatur.

I dette studiet ble fem termiske avlusninger på tre lokaliteter med kommersiell produksjon av atlantisk laks på Vestlandet evaluert med fokus på miljø-DNA prøver av vann, i tillegg til valideringsforsøk på lab hvor målet var å optimalisere miljø-DNA metoden. Første del av masterprosjektet var et bevis på prinsipp (PoP), en demonstrasjon med formål å verifisere at en miljø-DNA metode har potensial for anvendelse for påvisning av *P. atlantica* gv. *salmonicida* hos laksepopulasjoner. En feltstudie vil avdekke anvendeligheten av metoden under realistiske oppdrettsforhold som nødvendigvis ikke ville vært tilstede under *in vitro* studier. Den andre delen av prosjektet skulle optimalisere filtrering, og teste om lagringstid og oppbevaringstemperatur påvirket påvisning av *P. atlantica* gv. *salmonicida* i miljø-DNA-prøvene.

4.1 Real time PCR

Goldberg et al., (2016) anbefaler probe-basert qPCR for analyse av miljø-DNA-prøver dersom målet er å detektere en, eller få kjente arter, som det var i denne studien. Primer og probe fra Sandlund et al., (2021) ble testet for spesifisitet og effektivitet, og viste seg å være egnet for spesifikk deteksjon av *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Spesifisitetstesten viser at primere og

proben som ble benyttet ikke krysshybridiserer med nukleinsyrene til bakterieisolatene de ble testet mot.

Robuste og presise qPCR assay korreleres vanligvis med høy PCR-effektivitet. Det teoretiske maksimumet for amplifiseringseffektivitet er 1,00 (100 %), som indikerer at mengden av produkt dobler seg ved hver syklus (Bustin et al., 2009). For dette studiet ble et kjent bakterieisolat med *P. atlantica* gv. *salmonicida* dyrket opp, og videre benyttet for å regne ut amplifiseringseffektiviteten til det aktuelle assayet. Amplifiseringseffektiviteten ble beregnet til 1,013 (101,3 %), som er nær verdien for optimal effektivitet, og assayet ble regnet som effektivt nok for videre bruk i studiet. Den utregnede effektiviteten er basert på en rendyrket bakteriekultur, og ikke på miljø-DNA-prøver som studiet fokuserer på. Sensitiviteten til assayet mot en bakgrunn av miljø-DNA ble ikke beregnet i dette studiet. Analytisk sensitivitet refererer til minimum antall av kopier i en prøve som kan detekteres av et assay (Bustin et al., 2009). Teoretisk sett skal PCR kunne amplifisere ett eneste målmolekyl eksponentielt, men i realiteten krever de fleste PCR-reaksjonene noen flere kopier av målmolekyler. For å få en sikrere bekreftelse/avkreftelse på infeksjon med *P. atlantica* gv. *salmonicida* bør sensitiviteten til assayet videre kartlegges.

Miljø-DNA kan inneholde inhibitorer som ikke er tilstede i prøven med rendyrkede bakterier som ble nyttet til å konstruere fortynningskurven. Dette kan føre til en underestimering av DNA-mengdene i prøvene som er analysert videre i studiet. PCR er en enzymatisk reaksjon, og er sensitiv mot inhibering. Tilstedeværelsen av slike PCR-inhibitorer, som omfatter alle substanser som kan ha en negativ effekt på PCR-en er en stor ulempe ved å benytte PCR som metode for deteksjon av mikroorganismer i ulike prøver. PCR inhibitorer kan stamme fra den biologiske prøven, eller bli introdusert under prosessering av prøven eller under ekstraksjon av nukleinsyrer (Schrader et al., 2012). I beste fall påvirker disse inhibitorene sensitiviteten til assayet, men ved høy grad av inhibering kan de resultere i falske negative resultater (Schrader et al., 2012). I dette studiet er det ikke redegjort for eventuell tilstedeværelse av inhibitorer i de ulike biologiske prøvene som er analysert, selv om Goldberg et. al. (2016) anbefaler positive kontroller for å teste for inhibering. Analyseresultatene fra miljø-DNA-prøvene tatt på lokalitet B viser at den ene prøven tatt i merd 2 før trenging og den ene prøven tatt under trenging i merd 4 var negative for *P. atlantica* gv. *salmonicida* (tabell 3.7), mens de andre prøvene fra samme merd var positive. Dette kan for eksempel være et falsk negativt resultat på grunn av PCR-inhibitorer. Samtidig er fortynningseffekten i de åpne merdene høy, så det kan ikke utelukkes

at mål-DNAet ikke ble plukket opp akkurat i den aktuelle prøven. Videre arbeid med miljø-DNA metoden for påvisning av *P. atlantica* gv. *salmonicida* burde undersøke miljø-DNA-prøvene for tilstedeværelse av, og eventuelt fjerne PCR-inhibitorer som kan ha innvirkning på analyseresultatene. Det brukes ulike metoder for å undersøke tilstedeværelsen av inhibitorer, som for eksempel å amplifisere et referansegen parallelt med templatet, og deretter sammenligne ekspresjonsnivåene (Nolan et al., 2006). Denne tilnærmingen forutsetter imidlertid at de to analysene hemmes i samme grad.

En annen svakhet er at det ikke ble analysert flere replikater ved analyse med real time PCR. Ved å analysere flere replikater fra samme prøve kan man avdekke falske negativer. For analyse av miljø-DNA med real time PCR er det anbefalt med 3 eller flere replikater (Goldberg et al., 2016), mens prøvene undersøkt i dette studiet er analysert med ett replikat. En kan derfor ikke utelukke at det forekommer falske negative resultater.

4.2 Miljø-DNA

I forkant av behandlingen på lokalitet A i september var den ukentlige dødeligheten lav, <0,6 %. Ved uttaket i forbindelse med behandlingen hadde fisken få kliniske tegn med pasteurellose. PCR analyse av hjerte og nyrevev av de 20 individene viste at 30 % av individene positive for *P. atlantiva* gv. *salmonicida.* Disse positive analysene hadde høye Ct-verdier, mellom 31,14 og 36,07 (tabell 3.3). Resultatene av real time PCR analyse av hjerte og nyrevev etter uttaket på behandlingen i oktober viste en prevalens på 21 %. De positive analysene fra dette uttaket hadde også høye Ct-verdier (36,0-38,98). Høye Ct-verdier indikerer lavt innhold av målbakteriens DNA i vevsprøvene. På grunnlag av dette kan det se ut til de positive individene var bærere av bakterien, og at laksepopulasjonen hadde en sub-klinisk pasteurellose-infeksjon.

Tidligere studier anbefaler større volum og å samle inn flere vannprøver på samme sted for å detektere tilstedeværelsen av en målorganisme når konsentrasjonen er antatt lav i vannet (Rusch et al., 2018; D. A. Strand et al., 2019). Disse studiene skulle detektere ulike typer parasitter (*A. astaci* og *G. salaris*) i elver med en annen densitet enn det en kunne forvente fra denne studien, som baserer seg på å detektere bakterier i sjøvann på oppdrettsanlegg med laksepopulasjoner hvor en antar mye høyere konsentrasjon av mål-patogenet. Derimot kan målbakterien forekomme i lav densitet hos laksepopulasjoner med lav infeksjonsintensitet og lav prevalens. I denne studien ble det valgt å ta vannprøver på 0,5 L. Filtrering av 0,5 L sjøvann var vellykket for en lignende studie med *Y. ruckeri* (D. Strand et al., 2021). Fra merd ble det valgt å ta to

vannprøver à 0,5 L, mens det fra behandlingskammeret ble tatt én vannprøve à 0,5 L ved hvert prøvetakingstidspunkt. Dette fordi vi antok høyere konsentrasjon i behandlingskammeret enn i merdene. Et høyere antall prøver fra samme sted ville derimot økt sannsynligheten for å oppdage falske negative, og kunne videre blitt brukt for å estimere sannsynlighet for deteksjon (Goldberg et al., 2016). Ved å benytte større volum av sjøvann vil det derimot være mer sannsynlig å fange opp bakterien ved forekomst i lav tetthet. Samtidig kan filtrering av større volum øke risikoen for inhibering under PCR på grunn av PCR-inhibitorer (for eksempel salt og organisk materiale) i vannet (D. A. Strand et al., 2011; Tsai & Olson, 1992). En annen ulempe med store volum er at det blir et høyere innhold av organisk materiale som tetter filtrene, og resulterer med at en ikke får filtrert ønsket volum gjennom ett filter. Hvis tette filtre forekommer hyppig i en studie kan filter med større porestørrelse være en alternativ løsning (Turner et al., 2014), eventuelt kan større overflate på filteret vurderes. Ulempen med å bruke større filterporer kan være at målorganismen ikke «fanges», og kan dermed gå tapt under filtreringen. Ved denne studien ble det brukt filtre med en diameter på 47 mm og 0,45 μm porer. *P. atlantica* gv. *salmonicida* er 0,3 μm i diameter og 1,7-3,5 μm i lengde (Valheim et al., 2000), så filtre med denne porestørrelsen skal teoretisk sett fange opp målbakterien.

Miljøfaktorer som for eksempel variasjon i vanntemperatur, vannstrøm, værforhold, fisketetthet og biosikkerhetstiltak kan påvirke spredningen, og fortynningen av bakterien fra infisert fisk. Hos laksepopulasjoner med sub-klinisk pasteurellose-infeksjon og lav prevalens vil det skilles ut små mengder av målbakterien til omgivelsene. Den første delen av feltstudiet baserte seg på å finne ut hvilket prøvetakingssted en kunne finne høyeste konsentrasjon av *P. atlantica* gv. *salmonicida* i sjøvann. Siden det er umulig å observere om en organisme skiller ut DNA molekyler eller å følge med på bevegelsene til spesifikke DNA-molekyler i et akvatisk miljø fungerer miljø-DNA-prøver som «blindprøver». Det optimale prøvetakingsstedet vil derfor være der en anser det som mest sannsynlig å detektere målbakterien. Under de termiske behandlingene ble det derfor tatt prøver nedstrøms for merden før trenging, og under trenging i forbindelse med behandling. Sjøvannet fra merdene ble hentet rett under vannoverflaten, som var antatt mest sannsynlig sted i vannsøylen å finne bakterier som de infiserte fiskene skilte ut. I tillegg ble det tatt prøver fra behandlingskammeret, siden store mengder fisk pumpes gjennom behandlingsvannet som har begrenset vannutskiftningskapasitet. Fra behandlingskammeret ble det tatt prøver før oppstart av behandlingen, og mellom hver merd som ble behandlet. Dette gjorde at man kunne få en indikasjon på eventuell oppkonsentrering av *Pasteurella*-bakteriene underveis.

Et alternativ til vannprøver kan være svaberprøver fra for eksempel hud og/eller gjeller. Under uttak på lokalitet A i oktober ble det tatt svaberprøver. Fiskens hud og gjeller ble svabret etter fisken var pumpet gjennom behandlingsenheten. Resultatene etter analyse av svabrene viste at det var høy prevalens av positive prøver. Dette tyder på at det var bakterier i fiskens slimlag. Om bakteriene stammer fra behandlingsvannet eller om det er fisken selv som har skilt ut bakteriene under operasjonen er uvisst. Siden det var mye høyere prevalens fra svaberprøvene sammenlignet med PCR-analyse fra vevet kan det tenkes at bakteriene skilt ut fra smittet fisk festet seg i slimlaget til de andre fiskene som også ble behandlet. På feltuttaket ble det tatt ut få antall svaberprøver, og det må undersøkes bedre for å kunne si om dette også kan være en mulig deteksjonsmetode. En kan for eksempel ta svaberprøver under den ukentlige lusetellingen som anleggene gjennomfører. Da vil en være uavhengig av avlusningsoperasjonen som ikke forekommer like hyppig som lusetellingene. Dersom dette skal tas i bruk bør det undersøkes om bedøvelsesmidler som brukes under lusetelling degraderer DNAet eller påvirker videre analyse og deteksjon av bakterien.

En miljø-DNA-metode som baserer seg på innsamling av overflatevann fra merdene er trolig lite egnet for å bekrefte eller avkrefte pasteurellose infeksjoner med lav intensitet. På grunn av den store fortynningseffekten det er i åpent hav, i tillegg til at det skilles ut små mengder av målorganismen ved infeksjoner med lav intensitet vil det være vanskelig å «fange» målorganismene i overflatevannet. Fra behandlingen på lokalitet A i september ble det ikke påvist DNA fra bakterien i overflatevannet fra merdene, men en kunne se en nedgang i Ct-verdi i behandlingsvannet om en sammenligner prøven før oppstart, og etter behandling av merden (tabell 3.4). Dette kan indikere at fisken som behandles skiller ut *Pasteurella*-bakterier i behandlingsvannet, og det blir en oppkonsentrering av *Pasteurella* i vannet. En metode som baserte seg på overflatevannet ville gitt et negativt svar, mens en metode basert på prøver fra behandlingsvannet ville endt med en positiv påvisning. Selv om miljø-DNA-prøvene fra merd var negative, viste analyse av vevsprøvene fra fisken i merd 1 at det var infiserte individer i merden (tabell 3.3). Det ser derfor ut til at overflatevann fra merd er mindre egnet som prøvetakingssted sammenlignet med behandlingsvannet.

Dersom en sammenligner resultatene fra miljø-DNA prøvene tatt i behandlingskammeret før oppstart og etter fiskene i merdene er behandlet kan en se en nedgang i Ct-verdi, som indikerer en økt mengde DNA fra *Pasteurella*-bakteriene. Basert på endring i Ct-verdiene fra prøven før

oppstart og ved endt behandling kan man regne ut omtrent hvor mange ganger tettheten av bakteriene økte i løpet av behandlingen. Det kan derfor se ut som både fisk med sub-klinisk infeksjon og klinisk infeksjon skiller ut betydelige mengder bakterier underveis i varmtvannsbehandlinger, og at bakteriemengden oppkonsentreres i behandlingskammet ettersom fisken ble behandlet. Fra termisk behandling på lokalitet A i september (tabell 3.4) kan en for eksempel se at Ct-verdi fra miljø-DNA analyse fra behandlingskammeret før oppstart var 30,30 mens prøven tatt etter alle fire merdene var behandlet var 24,91 (beregnet Ct-verdi for 500 ml). Under den samme behandlingen ble det ikke påvist *P. atlantica* gv. *salmonicida* i miljø-DNA prøvene som er tatt i merdene, med unntak av den ene prøven tatt under trenging av fisken i merd 3.

En ulempe med vannprøvene tatt i behandlingskammeret var at de tettet filteret raskt, trolig grunnet høyt innhold av organisk materiale som slim, skjell og mikroorganismer. Grunnet dette ble det nyttet ulikt volum av disse vannprøvene, hvor det ble filtrert sjøvann frem til filtrene ble tett. Deretter ble det filtrerte volumet målt. For å lettere kunne sammenligne en endring i Ct-verdiene, og dermed få indikasjon på endring av bakteriemengden i vannet ble det beregnet en ny Ct-verdi som korrelerte med likt volum (500 ml). En utregnet Ct-verdi vil ikke gi like nøyaktige resultater som ved filtrering av likt volum. Et alternativ som kunne gitt mer nøyaktige resultater er å bruke flere filtre per vannprøve. Derimot utgjør filtrene en økonomisk kostnad. Siden fremtidig brukt av denne metoden hovedsakelig vil være å bekrefte eller avkrefte pasteurellose-infeksjoner, og at et nøyaktig estimat derfor ikke er primærmålet så ble det valgt å beregne Ct-verdien ut i fra volumet som ble filtrert gjennom ett filter ved dette prosjektet. En annen mulig løsning på tette filtre, og kostnaden det er å bruke flere filter for analyse av én vannprøve kan være å sentrifugere prøven. Da får man samlet en pellet av organisk materiale i bunn, og det er mulig å videre filtrert vannet. Deretter kan en kjøre én PCR-analyse på pelleten, og én analyse på det filteret som vannet filtreres gjennom.

Miljø-DNA analysene av vannprøvene tatt i behandlingskammeret før behandlingsoppstart viste at det var DNA fra *Pasteurella atlantica* gv. *salmonicida* tilstede i disse. Tilstedeværelse av DNA fra målbakterien i vannet før oppstart i behandlingsvannet kan bidra til falske positive diagnoser dersom denne metoden nyttes for deteksjon av infeksjon med *P. atlantica* hos laksepopulasjoner. En løsning på dette kan være for eksempel å ta en prøve av behandlingsvannet før oppstart, og ved endt behandling, eventuelt mellom hver merd som i denne studien, og videre sammenligne resultatene (Ct-verdiene) fra disse miljø-DNA-

analysene. Siden det er brukt real time PCR som deteksjonsverktøy kan man ikke si om dette DNAet stammer fra levende eller døde bakterier i behandlingsvannet. En mulig metode for å finne ut hvorvidt bakteriene er levende eller ikke er å så ut en liten mengde av det aktuelle sjøvannet på blodagar med 2 % NaCl. Dette ble utført under valideringsforsøkene, men det ble ikke funnet vekst av bakterier forenelig med *P. atlantica*, og det så ut til at veksten av *Vibrio* spp. «dominerte». Det finnes ikke selektivt medium for *Pasteurella* sp. noe som trolig er nødvendig for å dyrke opp bakterien fra aktivt sjøvann hvor det lever andre konkurrerende bakterier.

Uansett om DNAet fra *P. atlantica* gv. *salmonicida* i behandlingsvannet stammer fra levende eller døde bakterier kan det se ut til at det er behov for å styrke rengjøringspraksis av avlusningsutstyret. Dersom en sammenlignet innholdet av nukleinsyrer i vannet tatt i behandlingskammeret før oppstart, og sammenligner det med overflatevannet i merdene ser en at det er et mye høyere innhold i behandlingsvannet. Uavhengig av hvor nukleinsyrene i behandlingskammeret stammer fra burde ikke konsentrasjonen variere så mye fra sjøvannet i merdene. Det er begrenset med kunnskap om smitte i og fra avlusningsenheter, men dette må betraktes som en risikofaktor. Gode desinfeksjonsrutiner, og renhold av skråg og utstyr er essensielt for å begrense spredning av infeksjonssykdommer og forbedre biosikkerheten.

I forbindelse med avlusninger produserer fisken endokrine stresshormoner og blir stresset (Erikson et al., 2018), noe som kan bidra til nedsatt immunitet og økt mottagelighet for infeksiøse sykdommer. Patogene mikroorganismer kan ha evne til å produsere, og respondere til vertens endokrine hormoner, og betegnes som mikrobiell endokrinologi (Lyte, 1993). Dette kan gjøre infeksiøse mikroorganismer i stand til å direkte respondere til neurokjemikaliene som syntetiseres i etterkant av en stresshendelse, og deretter initiere en patogenisk prosess (Lyte, 2014). Det er for eksempel vist at *Y. ruckeri* eksponert for katekolaminene noradrenalin og dopamin får økt virulens i form av økt bevegelighet, dannelse av biofilm og økt vekst (Torabi Delshad et al., 2019). I likhet med bakterier vil sannsynligvis konsentrasjonen av stresshormoner også konsentreres i behandlingsvannet i termiske avlusere. Det er ikke undersøkt om *P. atlantica* gv. *salmonicida* kan interagere med vertens endokrinsystem, men dersom de evner det må operasjoner som behandling for lakselus, som medfører stress, sees på som høy risiko for spredning av bakteriene innen laksepopulasjoner. Det vil også være desto viktigere med god rengjøring av utstyret som benyttes, og sikre at det ikke er levende bakterier i for eksempel behandlingsvannet i avlusningsenhetene for best mulig smittesikring.

Oppbevaring av vannprøvene og filtrering av vannet er faktorer som kan påvirke den maksimale «recovery» av målbakterien, og dette avhenger av vannsystemet og målorganismen (Goldberg et al., 2016). Miljø-DNA begynner å brytes ned umiddelbart etter utskillelse (Thomsen, Kielgast, Iversen, Moller, et al., 2012; Thomsen, Kielgast, Iversen, Wiuf, et al., 2012). Denne prosessen fortsetter etter innsamling av prøven grunnet mekaniske krefter, mikrobiell aktivitet (nukleaser) og spontane kjemiske reaksjoner (Lindahl, 1993; Nielsen et al., 2007). For minimal nedbrytning av miljø-DNAet er man avhengig av filtrering av vannet så raskt som mulig etter innsamling. Filtrering i felt kan være et alternativ dersom man har tilgang på peristaltisk pumpe, og arbeidskapasitet til prosesseringen. Samtidig kan filtrering på laboratorium redusere tiden man må bruke i felt. Vannprøvene som ble samlet inn i dette masterprosjektet ble oppbevart kjølig under transport frem til filtrering på laboratoriet. Ved fremtidig bruk av miljø-DNA-metoden er det høyst sannsynlig at tilsette ved anleggene tar prøvene under behandling og sender prøvene med Posten. Det var derfor ønskelig å undersøke hvor stor grad av DNA-degradering og påvirkning på deteksjon som kunne forventes under tiden det tar for innsending av prøvene med Posten og dermed forsinkelse i bearbeiding av prøvene.

I forbindelse med validering av miljø-DNA metoden ble *P. atlantica* gv. *salmonicida* bakterier dyrket i flytende medium. Fra denne buljongen ble det sådd ut ti-folds fortynningsrekker på blodagar med 2 % NaCl for å estimere antall bakterier tilstede. Bakteriene ble dyrket i buljong ved romtemperatur med 200 rpm risting, og dyrkningstid varierte fra 20 til 40 timer avhengig av ønsket bakteriemengde. Antallet kolonier på agarskålene med vekst som var tellbar ble brukt til å beregne CFU/ml til de ulike fortynningene, og de ulike bakteriekulturene som ble benyttet. I resultatene for påvirkning av filtrering ved forskjellige pumpehastighet (tabell 3.9), og lagring over tid ved 4 °C og 22 °C (tabell 3.11 og 3.13), kan en se at CFU/ml beregnet ut i fra antall kolonier på de skålene med de lavere fortynningene ga en høyere verdi sammenlignet med CFU/ml beregnet ut fra de mer fortynnede bakteriekulturene. Forholdet mellom de utregnede CFU/ml var mindre for bakteriebuljongene som var dyrket i 40 timer (tabell 3.9 og 3.11) sammenlignet med bakteriekulturen som var dyrket i 20 timer (tabell 3.13). En forklaring på dette kan være at bakteriene har en hydrofob overflate som forårsaker flokkulering i det flytende mediet, og at ved tillaging av fortynningsrekkene ble ikke bakteriene fra buljongen godt nok blandet med det fysiologiske sjøvannet. Dette vil i så fall medføre en ujevn fordeling av bakteriene i fortynningsrekkene, og beregningen av antall levedyktige bakterier tilstede vil bli upresis. Ellul (2021) viste at *P. atlantica* dyrket i flytende medium flokkulerer i den tidlige lag-

fasen ved vekst, men at klumpene forsvinner ettersom celleantallet øker. Bakteriekulturer dyrket i TSB ved 20 °C med 200 rpm risting når sen eksponentiell fase ved omtrent 18-19 timer etter inokulering (Ellul et al., 2019). Dette kan forklare hvorfor det var større forskjell mellom verdiene for utregnede antall bakterier i fortynningene som ble laget fra bakteriekulturene som var dyrket i 20 timer sammenlignet med buljongene som vokste i 40 timer.

Dersom bakteriene klumper seg sammen i flytende medium kan det medføre en ujevn fordeling av bakterier til flaskene som inneholdt 500 ml sjøvann til tross for tilsetting av likt volum med buljong. Dette vil kunne resultere i noe ulike Ct-verdier for analyse av sjøvann som er tilsatt likt volum av aktuell bakteriebuljong. For forsøket med filtrering med ulike pumpehastigheter (3.4.1) hvor 500 ml sjøvann tilsatt 0,5 ml høstet bakteriekultur, kunne en se at Ct-verdiene varierte mellom 15,31 og 17,56. Flokkulering av bakterier i det flytende mediet, og videre ulik fordeling av bakterier til sjøvannet kan forklare ulikhetene i Ct-verdiene. Variasjonen av Ct-verdiene kan også være et resultat av prosesseringen, som DNA-ekstraksjon fra miljø-DNA-prøvene. Dette vil i så fall også påvirke forsøkene med lagring av sjøvannet over tid. Selv om antall bakterier i vannet er stabilt så vil Ct-verdiene variere noe grunnet ulikt antall bakterier tilsatt i de ulike flaskene med sjøvann.

De peristaltiske pumpene som benyttes for filtrering av miljø-DNA-prøver kan stilles inn på ulike hastigheter. Det ble derfor undersøkt om ulike pumpehastigheter påvirket deteksjonen av mål-DNAet i betydelig grad. Fra resultatene så en at det var de to prøvene med sjøvann filtrert med 700 ml/min hadde lavest Ct-verdi i gjennomsnitt. Prøvene filtrert ved 200 ml/min hadde høyest Ct-verdi i snitt, som kan indikere dårligst «recovery» av målorganismen. Dersom en ser på standardavviket ser en at det var de høyeste hastighetene som ga minst avvik. Det kan spekuleres i om bakteriene presses bedre inn i filtrene ved de høyere hastighetene. Dette må i så fall undersøkes mer, både med flere replikater ved hver hastighet i tillegg til forsøk med ulike mengde bakterier. Flokkulering av bakteriene i buljongen kan ha påvirket fordelingen av bakteriene i dette forsøket også, så det kan være bidragsgivende til resultatene. Totalt sett kan det se ut til at 700 ml/min er mest optimalt, men det ser ikke ut til at pumpehastighet har stor betydning for deteksjon basert på forsøket som ble utført her, med bakteriemengden som var valgt for forsøket.

Basert på resultatene fra lagringsforsøkene ser det ut til at prøver med lavt innhold av *P. atlantica* gv. *salmonicida* er utsatt for høyere grad av degradering under lagring sammenlignet

med vannprøver som har et mye høyere innhold av bakterien. Totalt sett ser det ut til at vannprøver samlet inn i felt på en fredag, som sendes med posten og filtreres påfølgende mandag skal kunne gi valide resultater, selv om de sendes uten kjøling. Dersom miljø-DNA-prøvene holdes kjølig kan de oppbevares i opp til en uke før degradering påvirker analyseresultatene. Lagringsforsøkene og forsøket med ulike pumpehastigheter ble utført med sjøvann hentet fra Puddefjorden i Bergen hvor det er stor avstand til nærmeste lakseoppdrett. Sjøvannet vil derfor ikke være det samme som sjøen ved lakseoppdrett hvor det er høy tetthet av laks og høyere innhold av organisk materiale. Det bør vurderes å utføre lignende studier med for eksempel vann samlet fra behandlingskammeret i avlusningsenheter for å få et mer realistisk resultat.

Det er ikke kjent om *P. atlantica* gv. *salmonicida* finnes som bakgrunnsflora i sjøvann, eller er utelukkende tilknyttet lakseoppdrett. De innsamlede miljø-DNA-prøvene med overflatevann fra ti tilfeldige steder rundt Bergen ga negative resultater etter analyse mot *P. atlantica* gv. *salmonicida*. Selv om det var små volum, og få antall prøver så kan det se ut til at en ikke finner bakterien overalt. Det burde derimot samles inn flere vannprøver over større områder og fra ulike dybder, og det bør vurderes større volum for et sikrere resultat.

5. Konklusjon og forslag til videre arbeid

Dette studiet har vist at miljø-DNA-prøver av sjøvann samlet under termisk avlusning er egnet som metode for å påvise kliniske og sub-kliniske infeksjoner av pasteurellose hos laksepopulasjoner. I tillegg er det vist at svaber fra hud og gjeller kan påvise *P. atlantica* gv. *salmonicida.* Resultatene indikerer også at *P. atlantica* gv. *salmonicida* ikke er en del av den bakterielle bakgrunnsfloraen i sjøvann. Det er derimot behov for videre optimalisering og validering av metodene. Dette kan gjøres ved å samle inn flere miljø-DNA-prøver av sjøvann og svaber, fra både anlegg med laksepopulasjoner hvor det ikke er mistanke om sykdommen og fra populasjoner med mistanke om pasteurellose. Det kan også være aktuelt å samle inn vannprøver fra kontrollerte smitteforsøk hvor en har kontroll over nøyaktig prevalens og infeksjonsintensitet. Da kan en sammenligne hvilken metode som fungerer best, og fortsette optimalisering av den aktuelle metoden som er foretrukken. Studiet viser også at det er behov for bedre rengjøring av avlusningsenheter. Det bør fremskaffes mer kunnskap om *Pasteurella* sin sensitivitet mot ulike desinfeksjonsmidler, og videre implementere effektive biosikkerhetstiltak for å begrense smittespredning. Det er også behov for videre validering av real time PCR-analyse av miljø-DNA-prøvene spesielt med hensyn på inhibitorer.

6. Referanser

Abolofia, J., Wilen, J. E. & Asche, F. (2017). The Cost of Lice: Quantifying the Impacts of Parasitic Sea Lice on Farmed Salmon. *Marine resource economics*, *32*(3), 329-349. https://doi.org/10.1086/691981

Alarcón, M., Gulla, S., Røsæg, M. V., Rønneseth, A., Wergeland, H., Poppe, T. T., … Colquhoun, D. J. (2016). Pasteurellosis in lumpsucker Cyclopterus lumpus, farmed in Norway. *J Fish Dis*, *39*(4), 489-495. https://doi.org/10.1111/jfd.12366

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L. & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environ. Sci. Technol*, *48*(3), 1819-1827. https://doi.org/10.1021/es404734p

Bernhardt, L.-V., Myrmel, M., Lillehaug, A., Qviller, L. & Chioma Weli, S. (2021). Filtration, concentration and detection of salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt salmon (Salmo salar) cohabitant challenge. *Dis Aquat Organ*, *144*, 61-73. https://doi.org/10.3354/dao03572

Birkbeck, T. H., Laidler, L. A., Grant, A. N. & Cox, D. I. (2002). Pasteurella skyensis sp. nov., isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Int J Syst Evol Microbiol*, *52*(Pt 3), 699-704. https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-699

Bleie, H. & Skrudland, A. (2014). Tap av Laksefisk i Sjø.

Brooker, A. J., Papadopoulou, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A. & Migaud, H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Vet Rec*, *183*(12), 383-383. https://doi.org/10.1136/vr.104966

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., … Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*, *55*(4), 611-622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*, *17*(4), 840-862. https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends Parasitol*, *22*(10), 475-483. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006

Desjardins, P. & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*, (45). https://doi.org/10.3791/2565

Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K. A. & Hjeltnes, B. (1987). *Vibrio salmonicida sp. nov., a New Fish Pathogen*. Washington, D.C.

Ellul, R. M. (2021). *Pasteurella atlantica in Norwegian lumpsuckers : Characterisation, pathogenicity, vaccine development and immune responses* The University of Bergen.

Ellul, R. M., Walde, C., Haugland, G. T., Wergeland, H. & Rønneseth, A. (2019). Pathogenicity of Pasteurella sp. in lumpsuckers (Cyclopterus lumpus L.). *J Fish Dis*, *42*(1), 35-46. https://doi.org/10.1111/jfd.12905

Erikson, U. G., Solvang, T., Schei, M., Ag, S. & Aalberg, K. (2018). Hydrolicer - Utredning av system, stress og velferd ved avlusing. I: SINTEF Ocean AS.

Fiskeridirektoratet. (2021). Akvakulturstatistikk: rensefisk. Hentet 4/11 2021 fra https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk

Foster, G., Ross, H. M., Malnick, H., Willems, A., Hutson, R. A., Reid, R. J. & Collins, M. D. (2000). Phocoenobacter uteri gen. nov., sp. nov., a new member of the family

Pasteurellaceae Pohl (1979) 1981 isolated from a harbour porpoise (Phocoena phocoena). *Int J Syst Evol Microbiol, 50*(1), 135-139. https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-135
Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.-L., Gauthier, M. & Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of Pasteurella piscicida (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus Photobacterium as Photobacterium damsela subsp. piscicida comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 45*(1), 139-144.
Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., … Gilbert, M. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in ecology and evolution, 7*(11), 1299-1307. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595
Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschitte der Medicin, 2*(6), 185-189.
Grøntvedt, R. N., Nerbøvik, I.-K. G., Viljugrein, H., Lillehaug, A., Nilsen, H. & Gjevre, A.-G. (2015). Termisk avlusning av laksefisk - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt.
Gulla, S., Nilsen, H., Olsen, A. B. & Colquhoun, D. (2020). Fiskepatogene *Pasteurella* i Norge. *Norsk Fiskeoppdrett, 11*, 46-47.
Hjeltnes, B., Andersen, K., Ellingsen, H. M. & Egidius, E. (1987). Experimental studies on the pathogenicity of a Vibrio sp. isolated from Atlantic salmon, Salmo salar L., suffering from Hitra Disease. *Journal of fish diseases, 10*(1), 21-27. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb00714.x
Haastein, T. & Holt, G. (1972). The occurrence of vibrio disease in wild Norwegian fish. *Journal of fish biology, 4*(1), 33-37. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1972.tb05650.x
Iversen, A., Hermansen, Ø., Nystøyl, R. & Hess, E. J. (2017). Kostnadsutvikling i lakseoppdrett – med fokus på fôr- og lusekostnader. I *Cost development in farming of Norwegian Salmon*: Nofima AS.
Janssen, W. A. & Surgalla, M. J. (1968). Morphology, Physiology, and Serology of a Pasteurella Species Pathogenic for White Perch (Roccus americanus). *J Bacteriol, 96*(5), 1606-1610. https://doi.org/10.1128/JB.96.5.1606-1610.1968
Johansen, R. (2013). Fiskehelserapporten 2012.
Jones, M. & Cox, D. (1999). Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (Salmo salar) associated with a member of the family Pasteurellaceae-a case history. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*.
Legård, B. K. & Strøm, S. B. (2020). Pasteurellosis in Atlantic salmon (Salmo salar) in Western Norway. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol, 40(4)*, 148-155.
Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature, 362*(6422), 709-715. https://doi.org/10.1038/362709a0
Lyte, M. (1993). The role of micobial endocrinology in infectious disease. *Journal of Endocrinology, 137*, 343-345.
Lyte, M. (2014). The effect of stress on microbial growth. *Anim. Health. Res. Rev, 15*(2), 172-174. https://doi.org/10.1017/S146625231400019X
Munro, A. L. S. & Hastings, T. S. (1993). Furunculosis. *Bacterial Diseases of Fish (V.Inglis, R. J. Roberts & N. R. Bromage, eds)*, 122-142.
Myhre Jensen, E., Horsberg, T. E., Sevatdal, S. & Helgesen, K. O. (2020). Trends in de-lousing of Norwegian farmed salmon from 2000-2019-Consumption of medicines, salmon louse resistance and non-medicinal control methods. *PLoS One, 15*(10), e0240894. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240894

Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D. & Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res*, *6*(1-2), 37-53. https://doi.org/10.1051/ebr:2007031

Nolan, T., Hands, R. E., Ogunkolade, W. & Bustin, S. A. (2006). SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal Biochem*, *351*(2), 308-310. https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.051

Nytrø, A. V., Vikingstad, E., Foss, A., Hangstad, T. A., Reynolds, P., Eliassen, G., … Imsland, A. K. (2014). The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (Cyclopterus lumpus L.). *Aquaculture*, *434*, 296-302. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.07.028

Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., Gismervik, K. & Stien, L. H. (2019). Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in aquaculture*, *11*(4), 1398-1417. https://doi.org/10.1111/raq.12299

Romalde, J. L. (2002). Photobacterium damselae subsp. piscicida: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol*, *5*(1), 3-9. https://doi.org/10.1007/s10123-002-0051-6

Roth, B. (2016). Avlusing av laksefisk med Optilice: Effektpåavlusing og fiskevelferd.

Rusch, J. C., Hansen, H., Strand, D. A., Markussen, T., Hytterød, S. & Vrålstad, T. (2018). Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite Gyrodactylus salaris and two of its hosts, Atlantic salmon (Salmo salar) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Parasit Vectors*, *11*(1), 333-333. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2916-3

Salvesen, Ø., Kvinnsland, H. H. & Bjerke, H. S. (2021). Vurdering av velferd og effekt under kombinasjonsbehandling med varmtvann og spyling –en pilotstudie.

Sandlund, N., Rønneseth, A., Ellul, R. M., Nylund, S. & Sandlund, L. (2021). Pasteurella spp. Infections in Atlantic salmon and lumpsucker. *Journal of fish diseases*, *44*(8), 1201-1214. https://doi.org/10.1111/jfd.13381

Sayer, M. D. J. & Reader, J. P. (1996). Exposure of goldsinny, rock cook and corkwing wrasse to low temperature and low salinity: Survival, blood physiology and seasonal variation. *Journal of fish biology*, *49*(1), 41-63. https://doi.org/10.1006/jfbi.1996.0135

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, *113*(5), 1014-1026. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E. & Boone, J. G. (1964). PASTEURELLA SP. FROM AN EPIZOOTIC OF WHITE PERCH (ROCCUS AMERICANUS) IN CHESAPEAKE BAY TIDEWATER AREAS. *J Bacteriol*, *88*(6), 1814-1815. https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1814-1815.1964

Sommerset, I., Jensen, B. B., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. (2021). Fiskehelserapporten 2020. *Veterinærinstituttets rapportserie nr. 41a/2021*.

Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E. & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev Vaccines*, *4*(1), 89-101. https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89

Sommerset, I., Walde, C. S., Jensen, B. B., Wiik-Nielsen, J., Bornø, G., Oliveira, V. H. S., … Brun, E. (2022). Fiskehelserapporten 2021. *Veterinærinstituttets rapportserie nr. 2a/2022*.

Statistisk sentralbyrå. (2022). Utenrikshandel med varer 09283: Eksport av fisk, etter land, statistikkvariabel, år og varegruppe. Hentet fra https://www.ssb.no/statbank/table/09283/

Strand, D., Rønneseth, A., Riborg, A., Gulla, S., Muhammad, S. N., Wiik-Nielsen, J. & Colquhoun, D. (2021). Miljø-DNA sporing av *Yersinia ruckeri* hos norsk oppdrettslaks. *Norsk Fiskeoppdrett*, *8*, 100-104.

Strand, D. A., Holst-Jensen, A., Viljugrein, H., Edvardsen, B., Klaveness, D., Jussila, J. & Vrålstad, T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis Aquat Organ*, *95*(1), 9-17. https://doi.org/10.3354/dao02334

Strand, D. A., Johnsen, S. I., Rusch, J. C., Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., … Tulloch, A. (2019). Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *The Journal of applied ecology*, *56*(7), 1661-1673. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13404

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M.-M., Godon, J.-J., Gibson, G. R., Collins, M. D. & Dore, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16 rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology*, *65*(11), 4799-4807.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Mol Ecol*, *21*(8), 1789-1793. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Moller, P. R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS One*, *7*(8), e41732. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732

Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., … Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol*, *21*(11), 2565-2573. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x

Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H. & Bossier, P. (2019). Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of Yersinia ruckeri in vitro and an in vivo evaluation in rainbow trout. *J Fish Dis*, *42*(4), 477-487. https://doi.org/10.1111/jfd.12934

Trůper, H. G. & De'clari, L. (1997). Taxonomic Note: Necessary Correction of Specific Epithets Formed as Substantives (Nouns) “in Apposition”. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *47*(3), 908-909. https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-908

Tsai, Y. L. & Olson, B. H. (1992). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, *58*(2), 754-757. https://doi.org/10.1128/AEM.58.2.754-757.1992

Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T. & Yamanaka, H. (2017). Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS One*, *12*(4), e0176608-e0176608. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608

Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., Lodge, D. M. & Gilbert, M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous macrobial eDNA. *Methods in ecology and evolution*, *5*(7), 676-684. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206

Valheim, M., Håstein, T., Myhr, E., Speilberg, L. & Ferguson, H. W. (2000). Varracalbmi: a new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, Salmo salar L. *Journal of fish diseases*, *23*(1), 61-70. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00209.x

van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., … Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, *13*(s3), 1-46. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x

Veterinærinstituttet. (2020). *Pasteurella skyensis* identifisert i Norge for første gang. Hentet fra https://www.vetinst.no/nyheter/pasteurella-skyensis-identifisert-i-norge-for-forste-gang

Weli, S. C., Tartor, H., Spilsberg, B., Dale, O. B. & Lillehaug, A. (2021). Short communication: Evaluation of charged membrane filters and buffers for concentration and recovery of infectious salmon anaemia virus in seawater. *PLoS One*, *16*(6), e0253297-e0253297. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253297

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. & Schubert, S. (2011). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, *93*(3), 965-974. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4

Vedlegg

1. Fremstilling av mikroskopipreparat
    I. Overfør sterilt vann til et rent objektglass
    II. Slem opp bakteriekolonier i vanndråpen
    III. Spre materialet utover objektglasset og la det lufttørke
    IV. Fikser bakteriefilmen ved å føre objektglasset gjennom en gassflamme 2-4 ganger med filmen opp.
    V. Luftavkjøl preparatet før farging.