

Oversendes UB dato 22.10.83
Kan/~~kan~~ ikke utlånes.

S. T. *[Signature]*
Eksamensinspektør



Isolering og karakterisering
av *Vibrio*-bakterier fra
laks (*Salmo salar* L.)
med "Hitrasjuka".

av

K. OLAV HOLM

Institutt for fiskerifag
Tromsø 1985



FORORD

Den eksperimentelle delen av dette studiet ble utført i tidsrommet 1983-85 ved avdeling for fiskerikjemi, Institutt for fiskerifag, Universitetet i Tromsø.

Veiledere har vært professor, dr. philos. Jan Raa og forsker dr. philos. Trond Jørgensen. Begge takkes for inspirerende og lærerik veiledning.

Samtidig rettes en takk til alle ved avdelingen for godt samarbeid og "moralsk" støtte gjennom hovedfagsperioden. En spesiell takk til ingeniørene Ellen Strøm og Klara Stensvåg for god hjelp underveis.

Norges Fiskeriforskningsråd (NFFR) takkes for økonomisk bistand ved innsamlingen av materialet.

Til slutt rettes en varm takk til min kone Inger for uvurderlig støtte, ikke minst på det økonomiske plan.

Tromsø, september 1985.

K. OLAV HOLM

INNHold

FORORD	1
KAPITTEL 1	
INNLEDNING - HITRASJUKE".	
1.1	Kort historikk - sjukdommens utbredelse. 2
1.2	Symptomer; makro- og mikroskopiske forandringer. 3
1.3	Sjukdommer med symptomer som minner om HS. 5
1.4	Hovedfagstema: Isolering og karakterisering av bakterier fra fisk med HS. 7
KAPITTEL 2	
ISOLERING - BOKJEMISK KARAKTERISERING.	
2.1	Bakterier - isolatenes geografiske spredning. 8
2.2	MATERIALER OG METODER. 10
2.2.1	Medier. 10
2.2.2	Vekstbetingelser. 11
2.2.3	Oppbevaring av bakterier. 12
2.2.4	Morfologi, bevegelighet og flagellering. 12
2.2.5	Innledende tester. 12
2.2.6	API 20B - test-kit (API SYSTEM S.A.; Frankrike.) 14
2.2.7	Andre tester; 14
2.3	RESULTATER: 19
2.3.1	Morfologi, bevegelse og flagellering. 19
2.3.2	Andre resultater. 22
2.4	DISKUSJON. 29
2.4.1	Innledende tester. 29
2.4.2	Sentrale egenskaper ved gruppen <i>Vibrio</i> . 30
2.4.3	<i>Vibrio</i> -bakterier forbundet med sjukdom hos fisk. 32

KAPITTEL 3

SEROLOGISK KARAKTERISERING AV BAKTERIER.

3.1	Innledning.	34
3.2	MATERIALER OG METODER.	37
3.2.1	Buffer løsninger.	37
3.2.2	Spesielle metoder:	38
3.2.3	Forsøksdyr - behandling og lagring av antisera.	38
3.2.4	Isolering av kanin IgG.	39
3.2.5	Kopling av protein til CNBr-aktivert Sepharose-4B.	39
3.2.6	Affinitetsrensing av sau anti-kaninIg antistoffer (ab ₂).	40
3.2.7	Iodering av proteiner (FRAKER & SPECK 1978).	40
3.2.8	Serologisk klassifisering av bakterier.	41
3.2.9	Parametre av mulig betydning for serologi-assayen.	41
3.3	RESULTATER:	45
3.4	DISKUSJON:	47

KAPITTEL 4

FINGERAVTRYKK" AV DNA FRA UTVALGTE VIBRIO SP. TEO-
BAKTERIER."

4.1	Innledning.	48
4.2	MATERIALER OG METODER:	48
4.2.1	Buffer løsninger.	48
4.2.2	Isolering av DNA.	49
4.2.3	Restriksjonsbehandling av DNA.	50
4.2.4	Polyacrylamidgel-elektroforese.	50
4.3	RESULTATER:	51
4.4	DISKUSJON.	54

SAMMENDRAG	56
------------	----

LITTERATURLISTE	58
-----------------	----

APPENDIX A	71
------------	----

KAPITTEL 1.

INNLEDNING - "HITRASJUKE".

1.1 Kort historikk - sjukdommens utbredelse.

Fiskeoppdrett er en raskt ekspanderende næring i Norge. I løpet av de siste 10-15 årene har produksjonen av oppdrettsfisk, spesielt laks, blitt mangedoblet. Mellom 80 og 90% av totalkvantum eksporteres, og fiskeoppdrett representerer en av Norges mest lovende eksportnæringer. Det største problem for dagens oppdrettere er sykdom på fisken. Tap som følge av sykdom var siste år av størrelsesorden 100-150 millioner kroner. Dette utgjør 10-15% av samlet eksportverdi for oppdrettsfisk. I følge opplysninger fra forsikringsselskapene forårsaket såkalt "Hitrasjuke" omlag 80% av dette tapet.

"Hitrasjuke" eller "kaldtvannsvibriose" (EGIDIUS et al. 1981, 1984) ble registrert første gang høsten 1977 i et sjøanlegg i nærheten av Hammerfest. Våren 1979 ble det registrert ett tilfelle av sykdommen i Nordland og ett på Smøla (POPPE et al. 1983). Senere samme år og den påfølgende vår ble stadig flere tilfeller av sykdommen registrert, særlig i området Hitra/Frøya hvor den etterhvert ble en økonomisk trussel. Antall tilfeller av sykdommen hadde en sterk økning i 1982 med de fleste registreringer i Troms, Herøy i Nordland, Hitra/Frøya området samt Mørekysten. Det ble ikke registrert utbrudd sør for Måløy (62°N; Ibid.). Høsten 1983 ble derimot utbrudd registrert lengre sør, og særlig utsatt var Bergensområdet (EGIDIUS et al. 1984). Status per idag er at utbrudd av "Hitrasjuke" har forekommet i salt- og brakvannsmiljø langs hele kysten fra Finnmark i nord til Rogaland i sør. Utbruddene har forekommet ytterst ved kysten og inne i fjorder, i store og små anlegg, nye såvel som gamle (HAASTEIN & POPPE 1983). Tilfeller av sykdommen er registrert i løpet av hele året, med overvekt på den kalde årstiden. Sykdommen er i de fleste tilfellene registrert hos laks som har gått omlag ett år i sjøen, men også eldre fisk og smolt har vært angrepet (POPPE et al. 1983). Den fisken som er størst, feitest og som vokser raskest synes mest utsatt for angrep. Regnbueørret er i liten grad påvirket, men noen få utbrudd er registrert (EGIDIUS et al. 1981, POPPE et al. 1983). Sykdommen er registrert i form av akutte utbrudd med høy dødelighet over kort tid (2-4 uker) eller som en mer kronisk preget lidelse med lav dødelighet over lang tid (HAASTEIN & POPPE 1983). Den samling av symptomer som preger sjukdomsbildet, inkludert omfattende blødninger, har gitt sykdommen det mer beskrivende navnet "Hemorrhagisk syndrom" (POPPE et al. 1983, 1985a). Forkortelsen HS benyttes heretter som betegnelse på "Hitrasjuke" eller "Hemorrhagisk syndrom".

1.2 Symptomer: makro- og mikroskopiske forandringer.

Adferdsendring i form av planløs (sidelengs) svømming nær overflaten er tidlige sykdomstegn. I enkelte tilfeller kan fisken stå vertikalt med hodet mot overflaten, eller den kan ligge tilsynelatende livløs nede i nota. Fisken er ofte sløv, nærmest apatisk (sommolent) og derfor relativt lett å fange. Fisk med diagnosen HS har gjerne en velfyllt tarm, noe som indikerer normal appetitt. Det er faktisk observert at fisken dør i det den, som en siste kraftanstrengelse tar foret.

Blant ytre tegn kan nevnes en ru (puklete) overflate som resultat av væskeansamling i skjell-lommene. Blødninger i huden, særlig på buken, er vanlig. Vevet omkring gattåpningen er gjerne oppsvulmet, og avføringen gulaktig, svært løs og blodig (diarre). Selve gattet stikker i flere tilfeller unormalt langt ut. Ytre sår kan observeres ved kroniske sjukeforløp. Fisken kan også ha noe utstående øyne (exophthalmus) og en mørkere farge enn normalt. Dette er imidlertid symptomer på generelt dårlig helse og ikke spesielt for fisk med HS. Fisk kan være angrepet av HS uten at det foreligger ytre symptomer.

Anemi (blodmangel) er relativt vanlig ved infeksjonstilstander hos fisk (FODA 1973; AMEND & SMITH 1974; HARBELL et al. 1979). Hos fisk med HS kommer tilstanden til uttrykk ved bleke gjeller og at indre organer ofte er blekere enn normalt. Gjennomsnittsverdier for hemoglobin (g/100ml) for sjuke (n=13) og friske laks (n=10) ble målt til henholdsvis 3.52 (SD=0.89) og 7.84 (SD=0.85). POPPE et al. (1983) har målt verdien hos sjuk fisk til 5.1 (n=10; SD ikke oppgitt). Normale hemoglobinverdier hos laks ligger i området 8-10 g/100ml (CONROY 1972; HARBELL et al. 1979).

I bukhulen hos en HS-fisk finner en ofte en klar, noen ganger blodig væske (ascites). Punktformige (petechiale) blødninger forekommer i bukhinnen. Slike karakteristiske blødninger kan også observeres i hjertemusklaturen, på svømmeblæren, i fettvevet mellom blindtarmene, i tarmveggen og på leveren. Leveren er ofte forstørret og er da gjerne gulaktig. Fargen kan imidlertid variere fra grågul til brunrød. Normal farge er kopperbrun. På overflaten av leveren ser en blødninger av varierende størrelse. Svømmeblæra er i tillegg til liknende blødninger, ofte fylt med blodig væske. Hjertesekken er også væskefylt og noe større enn normalt (POPPE et al. 1985 b). Milten er derimot ikke forstørret og regnes for å være et symptom som skiller HS fra klassisk vibriose (kap. 1.3).

Det finnes få opplysninger om **mikroskopiske (histopatologiske) forandringer** hos fisk med HS. POPPE et al. (1985 b) har beskrevet endringer i hjerte- og skjellettmusklatur. Muskeltråder svulmet opp og mistet etterhvert sitt karakteristiske stripete utseende. Opphopping av væske (ødem) mellom de enkelte muskeltråder var ikke uvanlig. Store mengder bakterier ble observert i slike skadete områder uten betennelsesforandringer i vevet omkring (ibid.). Tilsvarende forandringer kunne også observeres i tilsynelatende frisk fisk fra samme mære uten at bakterier ble påvist. Generell endotelskade i lever, nyre og milt synes også å være vanlig hos fisk med HS (BRAUN, pers. medd. 1984).

Serum fra HS-sjuk fisk er "blankt" i motsetning til den gule/ gulrosa fargen i normalserum. Dette avspeiler at en i blod fra fisk med HS finner lavere verdier for

total plasma-protein og albumin, noe som ikke er uvanlig ved infeksjonssykdommer (SHIEH & MACLEAN 1976). HUNN (1964; referert hos HARBELL et al. 1979) antyder årsaker som tap via utskilte væsker og redusert proteinsyntese som følge av vevsskader. Uspesifikk serumaktivitet (INGRAM 1980) målt ved evne til å hemolysere røde saueblodlegemer (SAKAI 1981a,b, 1983a,b,c) indikerer også klare forskjeller i konsentrasjoner av serumprotein: Resultater som ikke er tatt med i oppgaven viste at sera fra frisk fisk, i motsetning til sera fra HS-sjuk fisk, inneholdt faktorer som forårsaket hemolyse av saueblodlegemene. Denne serumaktiviteten i sera fra frisk fisk var varmelabil og krevde Mg^{2+} (ikke Ca^{2+}), noe som indikerer at komplementfaktorer er involvert.

Som en slags konklusjon kan en si at fisk med HS er preget av anemi og at blødninger og unormal utskillelse av væske dominerer bildet, både makro- og mikroskopisk. Det er uklart hvorvidt den anemiske tilstanden skyldes et spesifikt hemolysin (MUNN 1978, 1980), uspesifikke cytolysiner (MUNRO et al. 1980), feil i koagulasjonssystemet (lekkasjer) eller manglende nysyntese av blodlegemer. De vanligste makroskopiske sykdomsforandringer er misfarget lever og blødninger i bukhinne, på svømmeblæren og hjertet.

Årsaken(e) til sjukdommen har vært, og er gjenstand for diskusjon. I følge EGIDIUS et al. (1981, 1984) skyldes sjukdommen *Vibrio*-liknende bakterie som vokser langsomt. Bakterien ga ved injeksjon sjukdomssymptomer som (makroskopisk) tilsvarte HS, og bakterien kunne reisoleres fra død/døende fisk. Innledende forsøk med naturlig smitting støtter hypotesen om at denne bakterien er dødsårsaken; 5 fisk smittet ved badning i en fortennet bakteriesuspensjon ble overført til kar med ikke-smittet fisk. Etter 14 dager var 14 av 26 fisk døde. I et kontrollkar var derimot bare 1 av 26 død i samme periode (HJELTNES, pers. medd. 1985).

FJØLSTAD & HEYERAAS (1985) angir at forholdet mellom flerumettet fett og vitamin E/Selen i fiskeforet har sammenheng med HS. Forfatterne har undersøkt fisk døde av HS og funnet forandringer som likner på vitamin E/selen-mangel hos husdyr. Bakterier kunne ikke påvises i den døde fisken.

POPPE et al. (1983, 1985 b) beskriver sjukdommen som en "multifaktoriell produksjonslidelse der samspillet mellom flere uheldige faktorer kan forårsake sjukdomsutbrudd". Blant aktuelle faktorer nevnes arv, miljøfaktorer, forets sammensetning/kvalitet og virus/bakterier. Bakterier fra gruppene *Vibrio* og *Photobacterium* kunne isoleres fra sjuk fisk. Det ble imidlertid antatt at de tilhørte fiskens normale flora/-miljø og de ble derfor ikke ansett som den primære sjukdomsårsaken. Nyere resultater fra POPPE et al. (1985) angir en primærlidelse som i hovedsak kommer til uttrykk (mikroskopisk) ved muskeldegenerasjon. Manglende tilskudd av vitamin E/Selen antydes som en vesentlig årsak ut fra erfaringer innenfor veterinærmedisin. Utskilt væske (eksudat) mellom ødelagte muskelfibre utgjør et godt vekstsubstrat for bakterier. Denne svekkete ("substrat"-) tilstanden gjør fisken svært utsatt for angrep fra bakterier (ibid.).

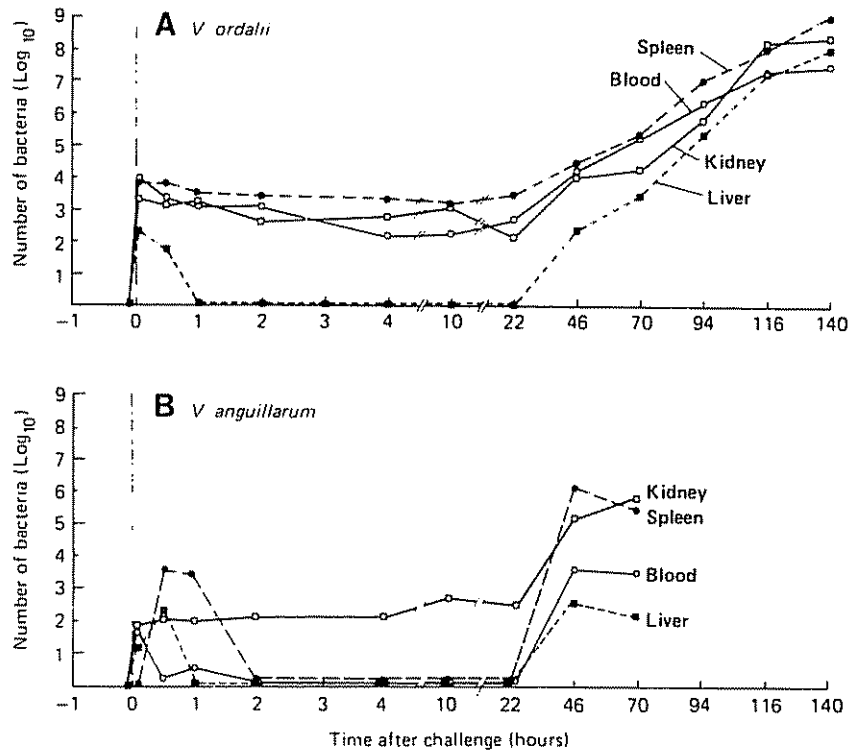
1.3 Sjukdommer med symptomer som minner om HS.

Egtvedtsjuke (Viral hemorrhagic septicaemia; VHS) er en virussjukdom med noe varierende symptomer. Blødninger i muskulatur og indre organer samt synkende blodprosent, er karakteristiske sjukeforandringer (HÅSTEIN & ROALD 1981). Fisk i alle aldre kan angripes, og tidlige stadier preges ofte av stor dødelighet uten spesielle sjukestegn. Senere stadier preges av alvorlige bevegelsesforstyrrelser og lavere dødelighet. Forekomster av VHS er begrenset til Europa (Ibid.; SALTE 1984). Symptomene likner de en finner hos laks med HS. Sjukdommen er mest vanlig hos regnbueørret, men VHS-viruset er patogent også for laks (SALTE 1984). Viruset ble sist isolert i Norge i 1974 (Ibid.). Alle kjente forsøk på å isolere eventuelle virus fra HS-laks har vært negative (POPPE et al. 1983, JØRGENSEN pers. medd. 1984).

Vibriose er en av de hyppigst forekommende og mest utbredte fiskesjukdommer. Den er beskrevet i mer enn 42 fiskearter, inkludert ål, torsk, sei, sild, ulike flatfiskarter og hos flere laksefisker (COLWELL & GRIMES 1984). Sjukdommen forekommer normalt i salt- og brakkvannsmiljø, men er også påvist i ferskvann, da gjerne i forbindelse med fisk som vandrer mellom salt- og ferskvannsmiljøer (SINDERMANN 1984). Det er vist at fisken bærer bakterien i seg (opportunistisk patogen) og at forskjellige former for stress kan utløse sjukdommen (SNIESZKO 1974; RØDSÆTER et al. 1977; BAKER et al. 1983). Klassisk vibriose er forårsaket av to biokjemisk, genetisk og serologisk forskjellige Gram negative bakterier; *Vibrio anguillarum* og *Vibrio ordalii* (SCHIEWE et al. 1981; SCHIEWE 1982). Ytre tegn på sjukdommen kan være sviktende appetitt og blødninger på buken, finnene og i øynene. Dødelighet forekommer imidlertid også uten slike karakteristiske symptomer. Sjukebildet forøvrig preges av indre blødninger, vevsskader (nekroser) med varierende fordeling av bakteriene i de forskjellige vev. En slik variasjon påvirkes selvsagt av vertens evne til forsvar mot inntrengende mikrober. RANDSØM et al. (1984) har imidlertid vist at de to patogene mikrobene, både *in vivo* og *in vitro* (naturlig smitte), forårsaket forskjellige indre sjukebilder: *V. anguillarum* fordelte seg jevnt i vevene med de høyeste konsentrasjoner i blod, løst bindevev, nyre, milt, gjeller og bakre del av tarmkanalen. Bakterier ble også påvist i skjelett- og hjertemusklatur. *V. ordalii* dannet derimot kolonier (aggregater) hovedsakelig i musklatur (skjelett-, hjerte- og glatt musklatur), i gjellevev, og i fremre- og bakre del av tarmkanalen. Store bakteriemengder ble ikke påvist ved mikroskopering av fargete blodpreparater. Metodiske begrensninger gjorde det imidlertid vanskelig å oppdage bakteriekonsentrasjoner mindre enn 3×10^6 organismer per ml blod (Ibid.). Begge bakteriene gav ved infeksjon store skader i bakre del av tarmkanalen der de også kunne påvises i tidlige stadier av infeksjonsforløpet. Dette sammen med en gunstig pH (6.5-8.0) i denne del av tarmen fikk RANDSØM til å konkludere med at infeksjonen muligens startet med kolonisering av dette området (Ibid.). Store bakteriemengder (10^8 - 10^9 bakterier/g vev) i døende fisk og store bakteriekonsentrasjoner like ved friskt vev, mente RANDSØM (ibid.) var en indikasjon på eventuelt lavpotente toksiner.

SCHIEWE (1983) fant i motsetning til RANDSØM et al. (1984) at *V. ordalii* utviklet en systemisk infeksjon, med bakterier i nyre, milt og blod. Denne uoverenstemmelsen skyldes sannsynligvis deres forskjellige måter å infisere fisken på (injeksjon under huden (s.c.) i motsetning til via vann, såkalt naturlig smitte). *V. anguillarum* (3.2

$\times 10^3$ kolonidannende enheter (CFU) injisert s.c.) spredte seg hurtigere og førte til en raskere død sammenliknet med tilsvarende *V. ordalii*-forsøk (7.7×10^6 CPU; s.c.). Figur 1.1 viser fordelingen over tid i sistnevnte forsøk.



FIGUR 1.1: Sammenlikning av spredningsmønsteret ved infeksjon av *V. ordalii* (A) og *V. anguillarum* (B) i Stillehavslaks (*Oncorhynchus kisutch*) ved 15°C. Bakterier ble injisert under huden (s.c.) ved tid 0: 7.7×10^6 CFU av *V. ordalii* eller 3.2×10^3 CFU av *V. anguillarum*. Antall levende bakterier per ml blod og per gram nyre, lever og milt ble bestemt (etter SCHIEWE 1983).

Virulensmekanismene hos disse *Vibrio*-bakteriene er mindre kjente. En plasmid-koplet opptaksmekanisme for jern (fra jernfattige miljø) inngår i virulens-"reportoaret" hos *V. anguillarum* og begynner etterhvert å bli klarlagt (CROSA 1980, CROSA et al. 1977, 1980, 1981, 1983; TOLMASKY & CROSA 1984; ACTIS et al. 1985). Ekstra cellulære produkter som hemolysiner og proteaser antas også involvert ved *V. anguillarum*-infeksjoner. Dette synes ikke å være tilfelle ved *V. ordalii*-infeksjoner (SCHIEWE et al. 1981; KODAMA et al. 1984; MOUSTAFA et al. 1984). TRUST et al. (1981) har påvist en sammenheng mellom virulens og utvalgte *V. ordalii*-stammers evne til å motstå uspesifikke bakteriedrepende komponenter i serum (INGRAM 1980) fra ikke-immunisert regnbueørret. Serum-sensitive mutanter testet *in vivo* var

betydelig mindre virulente, noe som indikerer at serumresistens er viktig for *V. ordalii* evne til å framkalle sjukdom (TRUST et al. 1981).

1.4 Hovedfagstema: Isolering og karakterisering av bakterier fra fisk med HS.

I de miljøer som har beskjeftiget seg lengst med HS, er det ingen uoverenstemmelse om at bakterier lar seg isolere fra døende og død laks med diagnosen HS (EGIDIUS et al. 1981, 1984; POPPE et al. 1983, 1985). Sjukdommens opphav/årsak (etiologi) er derimot mer omstridt. HS har, inntil nylig utelukkende vært et norsk fenomen. Unntak er at sjukdommen i år er ment påvist på Færøyene og i Skottland, og også her ble det funnet bakterier (HÅSTEIN, EGIDIUS pers medd. 1985). Sjukdommen er kun påvist i salt- og brakkvannsmiljø. Det er ikke rapportert om utbrudd fra ferskvannsmiljø, selv om samme type for blir benyttet. Sjukdommen har klare likhetspunkter med klassisk vibriose slik den kommer til uttrykk ved *Vibrio ordalii*-infeksjoner (RANDSOM et al. 1984; SCHIEWE 1983; SCHIEWE et al. 1981; EGIDIUS et al. 1981, 1984; POPPE et al. 1983, 1985). Det er ingen tvil om at bakterier som i utgangspunktet ikke virker sjukdomsframkallende kan forårsake sjukdom og død når fisken utsettes for stress (SNIESZKO 1974; COLWELL & GRIMES 1984). Nyere forskning har vist at også ugunstig forsammensetning og dårlig forkvalitet kan disponere for sjukdom ved at effekten av fiskens spesifikke og uspesifikke forsvarsmekasnismer svekkes radikalt (TANAKA et al 1979; BRANDON 1984; BENDICH et al. 1984; WATSON & PETRO 1984; BLAZER & WOLKE 1984; RØRSTAD 1985). Det kan også tenkes at balansen i fiskens naturlige bakterieflora forrykkes slik at potensielt patogene bakterier lettere får innpass. Bakterier som for eksempel, direkte eller indirekte, kan påvirke næringsopptaket vil også være aktuelle i denne sammenhengen.

Hovedhensikten med denne oppgaven er ikke å gi noen forklaring på primære- eller sekundære årsaker til utbrudd av HS, men å karakterisere en type bakterier som lot seg isolere fra nyrer hos døende fisk med diagnosen HS (kapittel 1.2). Isolatene viste enhetlige egenskaper, forskjellige fra kjente isolater, og var derfor interessante også ut fra rene mikrobiologiske betraktninger.

Kapittel 2 tar for seg isolering, biokjemisk karakterisering og klassifisering. I kapittel 3 behandles serologisk variasjon mellom HS-bakterier og kjente bakterier som det er naturlig å sammenlikne med. Kapittel 4 omfatter genetiske aspekter ved HS-bakterier. Ønsket er å kunne si noe om slektskap mellom bakterier ved å sammenlikne de elektroforetiske DNA-mønstre ("fingeravtrykkene") som kommer til uttrykk etter endonuklease (*HindIII*)-behandling av de respektive total-DNA.

KAPITTEL 2. ISOLERING - BIOKJEMISK KARAKTERISERING.

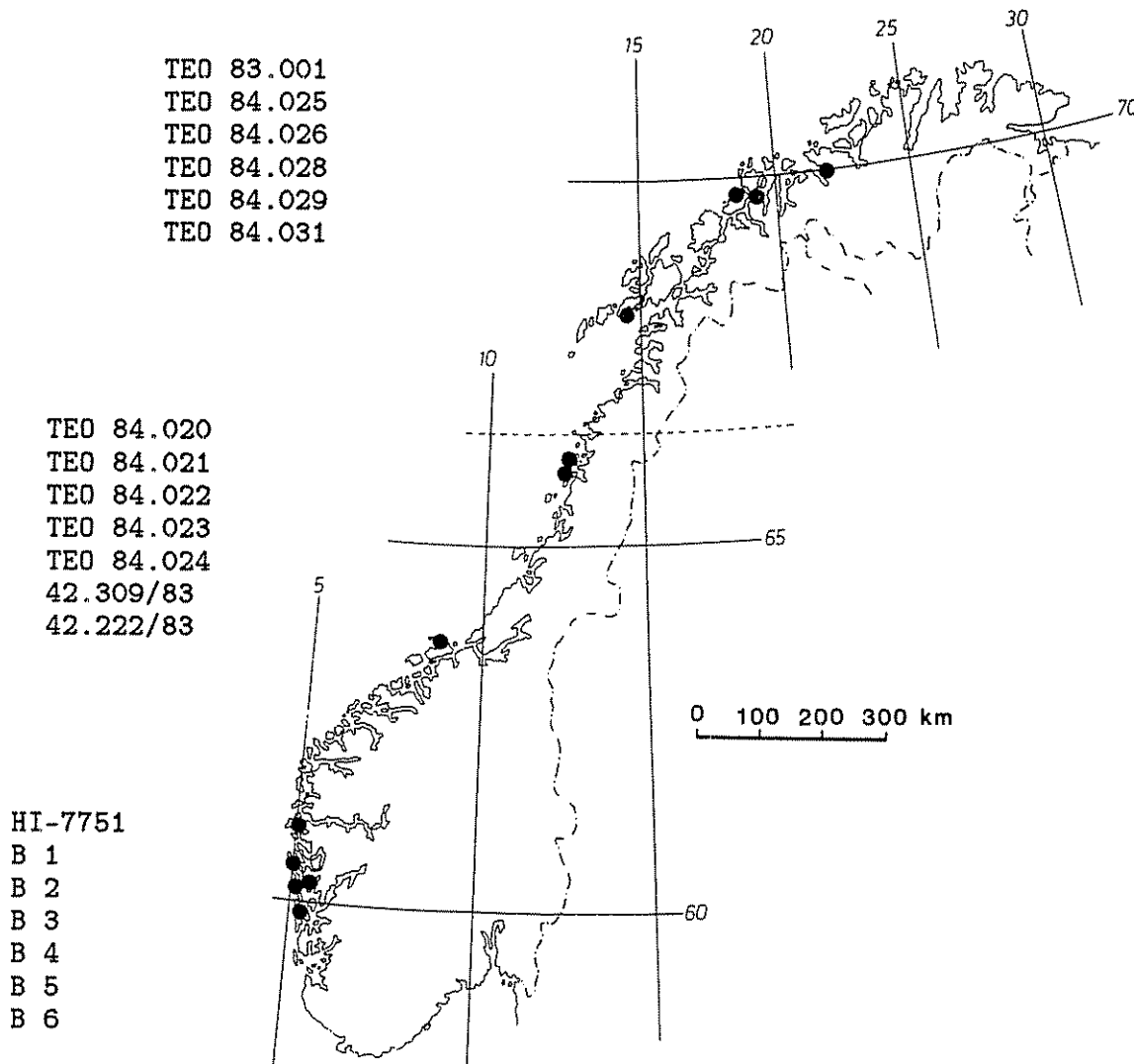
2.1 Bakterier - isolatenes geografiske spredning.

Fremre del av nyret ("blodranden") er sannsynligvis fiskens viktigste bloddannende organ. Dette organet fungerer også som filtreringsorgan for blod ("lymfeknute"). Siden fisk normalt ikke har bakterier i blodet, er derfor nyret et velegnet sted å lete etter bakterier ved mistanke om systemiske infeksjoner. Samtlige HS-isolater som benyttes er tatt fra fiske-nyrer: Levende laks med åpenbare sjukdomstegn (se innledning) ble bedøvet med MS-222 (etyl-m-aminobenzoatmesylat; 0.15 g/l; Norsk medisinaldepot) og deretter sprettet opp i buken. Nyret ble blottlagt og all væske tørket bort fra bukhulen. Deretter ble nyret åpnet med steril skalpell og blod strøket ut på skåler med blodagar (kap 2.2.1); 3 skåler per fisk. Under innsamlingen av materialet, ble skålene lagret ved 8°C (1-5 dager). Eventuell ytterligere inkubering foregikk ved 12°C. Innsamlingen av bakterier foregikk i første halvdel av august 1984. Materialet omfatter 11 isolater tatt fra Herøyholmen (Nordland) i sør til Badderen (Nord-Troms) i nord, 7 isolater fra Vestlandet (gave fra E.Egidius/B. Hjeltnes, HI, Bergen) samt 2 bakterier isolert fra HS-fisk ved Veterinærinstituttet (gave fra T. Poppe), ett isolat fra Herøy (Nordland) og ett fra Frøya (Trøndelag). Med unntak av en bakterie (B2) isolert fra regnbueørret på Vestlandet, er samtlige type TEO-bakterier isolert fra laks.

Som referanser ble det benyttet fire stammer:

Vibrio anguillarum NCMB 6 (*Gadus callaris*, Danmark)
Vibrio anguillarum NCMB 2129 (*Salmo gairdneri*, Norge)
Vibrio ordalii MSC2-75 (*Oncorhynchus kisutch*, USA)
Vibrio ordalii DF₁K (*O. kisutch*, USA; tidl. *Vibrio* sp. 1669)

I tillegg inngår følgende *V. anguillarum*-stammer: A3.1 (*G. morhua*) og H-F (*S. salar*) og 84.2018 (1-6), de 6 siste isolert fra regnbueørret (*S. gairdneri*) i Australia. Samtlige "tilleggs"-bakterier er karakterisert ved avdelingen (fiskerikjemi, IFF).



FIGUR 2.1 Bakteriernes geografiske spredning.

Bakterier med betegnelsen TEO er egne isolater. Betegnelsene HI og B står for isolater fra Havforskningen (Bergen), de to øvrige kommer fra Veterinærinstituttet.

2.2 MATERIALER OG METODER.

2.2.1 Medier.

(M2.1) Mineralsaltløsning (FORD et al. 1958):

	g/l	(mM)
MgCl ₂	20.0	(215)
CaCl ₂	5.0	(45)
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0.5	(1.8)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	(1.7)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.25	(1.1)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	(1.0)
NaMoO ₄	0.25	(1.4)
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.5	(2.2)

Saltene ble løst i 900 ml destillert vann, konsentrert H₂SO₄ tilsatt til klar løsning før volumet ble justert til 1000 ml.

(M2.2) HS-TEO medium (modifisert etter SCHIEWE 1981a).

	g/l	(mM)
Nutrient broth (Difco)	2.7	-
Proteose pepton (Difco)	5.0	-
NaCl	20.0	342
K ₂ HPO ₄	0.5	3.7
Mineralsaltløsning (M2.1)	10 ml	

pH ble justert til 7.4 før autoklivering (120°C/15 min).

(M2.3 a) Minimalmedium (pH 7.4).

	g/l	(mM)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.1	87
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.18	13
NaCl	15	256
KCl	2.0	26.8
NH ₄ Cl	1.0	18.7
Mineralsaltløsning (M2.1)	10 ml	

(M2.3 b) Basal-medium (pH 7.5; BAUMANN & SCHUBERT 1984).

	g/l	(mM)
Tris-HCl	6.1	50
NH ₄ Cl	1.0	19
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.075	0.33
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.028	0.1
tilsatt 1/2 styrke ASW (se nedenfor).		

ASW Kunstig sjøvann (MACLEOD 1968).

	g/l	(mM)
NaCl	23.4	400
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24.6	100
KCl	1.5	20
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.9	20

Saltene ble løst hver for seg og deretter blandet.

(M2.4) API 20-medium (modifisert).

	g/l	(mM)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	13.2
Gjærekstrakt (Difco)	1.0	-
NaCl	20.0	342
K_2HPO_4	0.5	3.7
Mineralsaltløsning (M2.1)	10 ml	-

Ingrediensene ble løst i 900 ml dest vann og pH justert til 7.5 før totalvolumet ble økt til 1000 ml.

(FP) Fiskepermeat/-autolysat.

Den lavmolekylære (MW < 10.000), vannløselige fraksjon fra sur (HCl) autolyse av fiskeinnvoller har vist seg å være et godt vekstsubstrat for bakterier (CLAUSEN, GILDBERG & RAA 1985). Substratet (permeatet; pH 3.1) var en gave fra A. Gildberg (Fiskeriteknologisk Forskningsinstitutt, Tromsø). pH ble justert til 7.5 (FP-7.5) med 5M NaOH. Utfelt materiale ble filtrert fra (Whatman No.1) og løsningen sterilfiltrert før bruk. Utfelt materiale ble analysert med hensyn på tørrvekt og aske. Aminosyreanalyse av permeat og filtrat viste tilnærmet uendrete aminosyreprofiler (analysene ble foretatt av E. Strøm ved hjelp av en JEOL (JLC-6 AH) aminosyreanalysator). Mengde aminosyrer lå i området 87-95 mg/ml i både permeat og filtrat (FP-7.5). Det utfelte materialet besto i hovedsak av uorganisk materiale (88.8% av tørrvekten var aske).

Fastmedier:

Bacto Tryptic Soy Agar (Difco; 40 g/l) eller Bacto Tryptose Blood Agar Base (Difco; 33 g/l) ble benyttet ved dyrking på skåler/skråagar. Begge medier ble tilsatt ekstra NaCl (0.25 M). Blodagar ble laget ved at mediene etter autoklaving (120°C/15 minutter) og avkjøling til 45-50°C (vannbad) ble tilsatt 5% humant fullblod eventuelt 3% røde blodceller. "Tryptic Soy Agar" uten blod betegnes **TSA**; medium med blod betegnes **blodagar**.

2.2.2 Vekstbetingelser.

Dersom ikke annet er nevnt, ble vekstforsøk utført ved følgende betingelser: 50 ml Erlenmeyer-kolber med maksimalt 15 ml medium ble autoklavert ved 120°C i 20 minutter. Det ble benyttet 0.22 um Millex-GS filter (Millipore, Frankrike) og sterile engangsprøyter (Sabre Gillette, England) ved sterilfiltrering av mediumkomponenter. Kulturene ble dyrket i Termaks temperaturskap ved 250 omdreininger per minutt på en (orbital-) rystemaskin (New Brunswick scientific Co. Ltd.; USA). Maksimal lagringstid for medier var 2 uker ved 4°C. Mediene ble før inokulering preinkubert 1-2 døgn ved den aktuelle dyrkingstemperaturen (vanligvis 12°C). pH justeringer ble dersom ikke annet er nevnt, foretatt med 1M HCl og 1M NaOH.

2.2.3 Oppbevaring av bakterier.

Monokulturer dyrket i flytende medium ved 12°C ble tilsatt steril glycerol (sluttkonsentrasjon: 20%) og frosset ved -80°C i sterile 1 ml rør (Nunc Inter Med; Danmark). "Arbeidskulturer" på skråagar ble overført hver måned og lagret ved 4°C; maksimalt 4 overføringer.

2.2.4 Morfologi, bevegelighet og flagellering.

Bakteriens morfologi og bevegelse ble undersøkt ved vanlig mørkefelts mikroskopering (1000x forstørrelse). Bakteriene var så aktive at det aldri var noe problem å skille egenbevegelse fra Brownske bevegelser eller "drift" i mediet. "Hang-drop" preparater ble ikke benyttet.

Flagellering i flytende og på fast medium ble undersøkt ved elektronmikroskopering av negativt-fargete preparater: Bakterier ble slemmet opp i ammoniumacetat-buffer (0.2 M, pH 6.2) tilsatt 0.2% fosforwolframsyre (Merck p.a.). En dråpe av suspensjonen ble etter 5-10 minutter satt på en "gridd" med formvarhinne med på-dampet karbon. Etter ytterligere 3-4 minutter ble væsken trukket bort med filtrerpapir før preparatet ble lufttørket og undersøkt i et JEOL 1200 EX elektronmikroskop.

2.2.5 Innledende tester.

Gram-reaksjon.

På bakgrunn av fysisk-kjemiske strukturforskjeller i bakteriecelleveggen deler denne fargeteknikken bakterier i to klasser: G+ beholder fargen (krystallfiolett=gentianafiolett) etter behandlingen, G- gjør det ikke. Gramreaksjonen gir i enkelte tilfeller varierende resultater avhengig av kultur-alder (HARRIGAN & McCANCE 1966). Det er derfor konsekvent benyttet bakterier i tidlig vekstfase dyrket på agar (TSA, blodagar): Varmefikserte bakterier ble farget 1-2 minutter med krystallfiolett før behandling med en I₂/KI-løsning (1-2 min). Deretter fulgte vasking med 96% etanol (10-20 sek) og destillert vann før kontrastfarging med safranin eller carbol fuchsin (30 sek). Som G- kontroll ble benyttet *Vibrio anguillarum* NCMB 2129. G+ kontroll var *Bacillus megaterium*.

Spore- og kapsel-farging (HARRIGAN & McCANCE 1966).

Bakterier ble blandet med en liten dråpe tusj ("Indian ink") og et dekkglass presset mot preparatet før mikroskopering (1000x). En eventuell kapsel er synlig som en klar sone rundt bakterien. Sporedannelse ble undersøkt ved 10 minutters farging av et varmfiksert preparat (på objektglass) med en mett vandig løsning av malakittgrønn. Etter vasking med destillert vann (10 sek) og kontrastfarging med safranin (0.25%; 15 sek), ble preparatet vasket, tørket og mikroskopert (1000x).

Oksydase (KOVACS, 1956).

Ved cytokrom (c) oksydase-aktivitet dannes et purpurfarget kompleks med tetrametyl-1.4-difenyldiamin (tetrametylparafenyldiamin). Bakteriekulturer dyrket 24-48 timer på fastmedium uten karbohydrater (HUNT et al. 1981; TSA og blodagar) ble smurt på filterpapir (Whatman No.1) fuktet med tetrametyl-1.4-difenyldiamin (1% løsning). Purpurfarging i løpet av 5-10 sek ble registrert som positivt resultat. Omslag i tidsrommet 10-60 sekunder ble registrert som forsinket positiv. Enhver seinere reaksjon ble registrert som negativ.

Oksydasjon eller fermentering av glukose (OF-test).

Følgende medium ble benyttet for å teste oksydativ/fermentativ omsetning av glukose: 2.7 g Nutrient broth (Difco), 5.0 g Proteose pepton (Difco), 20.0 g NaCl, 0.3 g K_2HPO_4 , 10 ml mineralsaltløsning pr 1000 ml destillert vann. pH ble justert til 7.3 (5M KOH) før tilsetning av indikator (12 mg fenolrød). Testen ble foretatt i reagensrør (15 ml medium) med omvendte Durhamrør. Etter autoklaving ble en sterilfiltrert, pH justert glukoseløsning tilsatt (sluttkonsentrasjon: 25 mM). pH før inokulering var 7.3. Tre rør per bakterie ble inokulert med 200 ul av en kultur (dyrket på mediet uten glukose) fortynnet til $OD_{600}=0.2$: ett rør uten glukose, to rør med glukose hvorav ett ble dekket med steril mineralolje. Rørene ble inkubert inntil 14 dager ved 12°C. Syreproduksjon (omslag til gult) og gassdannelse indikerte oksydasjon. Syreproduksjon i rør dekket med mineralolje indikerte fermentering.

Bakterienes krav til NaCl, temperatur og pH.

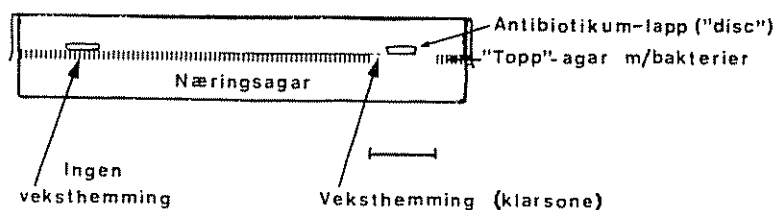
To agarmedier ble benyttet ved undersøkelsen av bakterienes krav til, og toleransegrenser for NaCl. HS-TEO medium (kap. 2.2.1) og et modifisert "Tryptic soy agar" (TSA)-medium ble tilsatt disse NaCl konsentrasjonene: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0%. Følgende (flytende) medium ble benyttet for å bestemme den optimale NaCl-konsentrasjonen: 11.2 g/l "Marine broth" (MB-medium; Difco), 100 mM Tris base (Difco) og 4 g/l gjærekstrakt (Difco), pH ble justert til 7.4. Konsentrasjoner i området 100-800 mM NaCl ble testet (figur 2.6).

Bakterienes temperaturløselighet ble undersøkt ved dyrking på blodagar. Utvalgte bakterier ble dyrket i flytende medium (HS-TEO tilsatt FP-7.5) og vekstforløpet ble registrert ved følgende temperaturer: 7, 12, 16, 18, 25 og 37°C (figur 2.7).

MB-medium ("Marine broth") tilsatt 100 mM Tris-HCl ble benyttet til bestemmelse av bakterienes optimale pH-område. Testete pH-verdier var 6.2, 7.0, 7.5, 8.0 og 9.0 (figur 2.8). Ved samtlige av vekstforsøkene ble det benyttet to paralleller.

Veksthemming.

Bakterienes følsomhet for utvalgte antibiotika ble undersøkt ved bruk av "resistenslapper". Bakteriene ble støpt inn i en toppagar lagt som et tynt skikt over en næringsagar (blodagar og TSA) slik figuren viser. Hemming (+), eventuelt ingen hemming (-; ingen klarsoner) ble registrert.



FIGUR 2.2 Prinsipp for testing av antibiotika-resistens.

2.2.6 API 20B - test-kit (API SYSTEM S.A.: Frankrike.)

Systemet ble benyttet ved kontrolltesting av kulturene. Forkulturer ble dyrket (24 timer/12°C) på et modifisert API 20B-medium (kap. 2.2.1). API test-"kit" har vist seg velegnet også for marine bakterier etter ekstra tilsetning av NaCl (marine salter) i de benyttete dyrkningsmedia (KENT 1982; MAUGERI et al. 1983). Følgende tester inngår: spaltning av gelatin, nitrat-reduksjon, beta-galaktosidase (ONPG), sure omsetningsprodukter ved omsetning av karbohydrater (sakkarose, L-arabinose, mannitol, fruktose, glukose, maltose, stivelse, rhamnose, galaktose, mannose, sorbitol og glycerol), hydrolyse av urea, tryptofanase, H₂S-dannelse, produksjon av acetoin fra pyruvat (Voges-Proskauer), Simmons citrat-test, Cytokrom-oksydase og katalase.

2.2.7 Andre tester:

Katalase test.

Kolonier grodd 50-60 timer på fastmedium (TSA) ble testet med hensyn til produksjon av katalase: En koloni ble blandet med en dråpe 3% H₂O₂ på objektglass. Alternativt ble et lite volum av en flytende kultur (i vekstfase) blandet med et likt volum 10% H₂O₂. Eventuell katalase vil dekomponere hydrogenperoksyd og danne O₂ som kommer til syne i form av bobler ("brusing").

Fermentering av andre C-kilder.

Ovenstående OF-test ble benyttet også for testing av bakterienes evne til å fermentere andre karbonkilder. Glukosen ble da erstattet med: L-arabinose, cellobiose, fruktose, galaktose, glycerol, inositol, laktat, laktose, maltose, mannose, mannitol, raffinose, rhamnose, ribose, sorbitol, sukrose, tartrat og xylose. (De understreket sukkerer tilsatt i 1% slutt-konsentrasjon, de øvrige 0.5% (w/v)).

Fermenteringsstudier ble også utført ved bruk av **API 50 CH**. Dette testsystemet omfatter 50 skoformete brønner med en anaerob del (fermenteringsstudier) og en aerob del (assimilasjons- og oksydasjonsstudier). Den første blant 50 brønner inneholder en negativ kontroll. De øvrige inneholder forskjellige karbohydrater og derivater av slike. De karbon-kilder som inngikk er listet i appendix (Tabell A 2.1). Forkulturer ble dyrket på HS-TEO medium til en bestemt tetthet (OD₆₀₀=0.2) før tilsetning av indikator (fenolrød). Kulturen ble deretter pipettert over i den anaerobe

delen av brønnene. Den aerobe del ble fylt med steril mineralolje. Registreringer ble foretatt etter 6 og 24 timer, deretter hvert døgn i 7 døgn. Testsystemet inngikk ved rutinekontroller av bakteriene.

Utnyttelse av citrat

A)..... som eneste energikilde (**Simmons citrat test**).

Følgende (skråagar) medium ble benyttet: 20.0 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g $NH_4H_2PO_4$, 1.0 g K_2HPO_4 , 5.0 g Na-citrat, 8 ml bromtymolblå (1% vandig løsning), 15 g agar pr 1000 ml dest H_2O . pH ble justert til 7.1 før tilsetning av indikator og autoklaving. Utnyttelse av citrat og vekst på agaren resulterer i en basisk reaksjon (fargeomslag fra grønn til klar blå). To paralleller samt nødvendige kontroller ble inkubert 1-14 dager ved 12°C.

B)..... som eneste karbonkilde i nærvær av organisk nitrogen.

Bakteriene ble dyrket på følgende modifiserte **Christensen medium** (Difco): 0.1 g gjærekstrakt, 0.1 g cystein-HCl, 3.0 g Na-citrat, 0.2 g glukose, 1.0 g K_2HPO_4 , 20.0 g NaCl, 10 ml mineralsaltløsning, 12 mg fenolrød pr 1000 ml dest H_2O . pH ble justert til 7.3 før autoklaving. Bakteriene ble testet i flytende kultur og på fast medium (1.5% agar). Inokulering/ poding fra fast medium, før inkubering ved 12°C i 1-14 dager. Utnyttelse av citrat indikeres av fargeomslag fra orange til rød/ lilla som følge av pH stigning.

Voges-Proskauer test på acetoin.

Acetoin (acetylmetylcarbinol) dannet ved sukkerfermentering kan påvises ved bruk av alfa-naftol. I basisk miljø vil eventuell acetoin tilstede oksyderes til diacetyl som kombinert med testreagens gir en fargereaksjon (rødfarging). I testen inngikk et fosfatbufret pepton-glukosemedium (5.0 g pepton, 5.0 g glukose, 5.0 g K_2HPO_4 , 20 g NaCl i 1000 ml springvann; final pH 7.4. Testreagenser var 6% -naftol løst i 96% EtOH samt en 16% KOH løsning (BARRIT 1936 referert hos HARRIGAN & McCANCE 1966). Kulturrør (10 ml medium dekket av mineralolje) ble etter inokulering fra fastmedium (TSA) inkubert 2-8 dager ved 12°C. Test: 1 ml kultur ble tilsatt 0.5 ml av hver av testreagensene og rystet godt. Rødfarging i løpet av 5 minutter ble registrert som positiv reaksjon (acetoin tilstede).

Reduksjon av nitrat til nitritt.

Nitrat er ofte utgangspunkt for aminosyresyntesen i mikroorganismer. Nitrogenet i nitrat har valensen +5, i aminosyrer (aminogruppen) har nitrogenet valensen -3. Nitrogenet må altså reduseres. Nærmeste teoretiske forbindelse på denne reduksjonsveien er nitritt (valens +3). De fleste nitrat-reduserende bakterier er fakultativt anaerobe (THAUER et al. 1977 referert hos STYRVOLD 1981). Respiratorisk nitrat-reduktase er et membranbundet enzym-kompleks som gjør at nitrat kan inngå som terminal elektronakseptor i celler ved anaerob vekst. Syntese av enzymet induseres av nitrat ved fravær av oksygen og hemmes ved aerob vekst

(HADDOCK & JONES (1977) referert hos MCPHERSON et al. (1984)). NO_2^- er fargeløst, men danner sammen med sulfanilsyre og alfa-naftylamin et (lyse)rødt kompleks. I tilfelle negative reaksjoner tilsettes sinkstøv. I det sure miljøet reduseres eventuelt gjenværende NO_3^- til NO_2^- som så gir rødfarging. Testen ble utført etter dyrking på kaliumnitrat-medium (Bacto: 3.0 g kjøtttekstrakt, 5.0 g pepton, 1.0 g KNO_3 tilsatt 20 g NaCl; pH etter autoklaving 7.4). Dyrkingsrørene ble inokulert fra fastmedium (blodagar) og inkubert 1-8 dager ved 12 °C i rør dekket med 4-5 mm steril mineralolje. Testreagenset (Griess-Ilsovoy) bestod av to komponenter (5M eddiksyreløsninger av 0.5% alfa-naftylamin og 0.8% sulfanilsyre) som ble blandet (1:1) før bruk. En dråpe testreagens blandet med en dråpe bakterie suspensjon resulterte i rødfarging i løpet av få minutter dersom nitritt var tilstede. Tilstedeværelse av nitritt ble eventuelt bekreftet med "Nitrit (NO_2^-) test-strips" (Merckoquant 10007). Negative reaksjoner ble bekreftet ved tilsetting av metallisk Zn-pulver. Utvikling av rødfarge indikerer at nitrat fortsatt er tilstede. Dersom både NO_3^- og NO_2^- mangler, indikerer det ytterligere reduksjon til N_2 (denitrifikasjon) eller NH_4^+ (assimilatorisk nitratreduksjon).

Stimulering av vekst med trimetylaminn oksyd.

Trimetylaminn oksyd (TMAO) er et vanlig organisk molekyl i det marine miljø. Det finnes i marine dyr, og når disse dør, vil bakterier redusere TMAO til trimetylaminn (TMA) som gir en karakteristisk fiskelukt (STRØM et al. 1979). Hos bakterier kan TMAO inngå som terminal elektronakseptor i en anaerob, energigivende respirasjonsprosess. TMAO kan også bidra gjennom en ikke-energigivende redoksprosess koplet til substratfosforylering ved at $\text{NADH} + \text{H}^+$ oksyderes til NAD^+ (THAUER et al. 1977). Marine bakterier som kan utnytte det lett tilgjengelige TMAO, har en åpenbar fordel sammenliknet med de bakterier som under anaerobe forhold kun er i stand til enkel fermentering. Et tilleggspoeng er at trimetylaminn (TMA), på grunn av sine basiske egenskaper, vil motvirke det pH-fall som forekommer tidlig under mikrobiell nedbryting av døde organismer. Følgende grunnmedium (M) ble benyttet ved vekststudier: Marine broth (MB; Difco) 11.2 g/l (dvs. 1.4 g/l pepton, 0.3 g/l gjærekstrakt samt havsalter), 14 g/l NaCl (240 mM i tillegg til de 100 som inngikk i MB) og 6.1 g/l (50 mM) Tris-HCl. pH i medier med TMAO ble justert til 7.2. Medier uten TMAO hadde i utgangspunktet pH 7.5 (STRØM et al. 1979). Forkulturer ble tilsatt ekstra gjærekstrakt (0.05%; v/w).

Kulturer med og uten 5 mM glukose og 50 mM TMAO (NO_3^-) ble dyrket anaerobt ved 12°C. Pyruvat (10 mM) med og uten TMAO inngikk også i forsøksoppsettet. Det ble benyttet 2% inokulum fra forkulturer i eksponensiell vekst ($\text{OD}_{600}=0.3$). I tillegg til TEO 83.001 inngikk NCMB 6 for sammenlikningens skyld.

Møllers dekarboksylase test (HARRIGAN & McCANCE 1966).

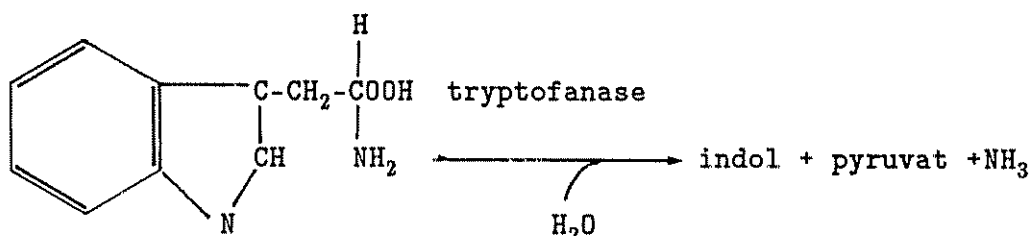
Dekarboksylering av en del aminosyrer gir primære aminer med spesielle biologiske funksjoner. Ett eksempel er arginin som dekarboksyleres til agmatin, en forløper for polyaminer. Disse inngår som vekstfaktorer for en del mikroorganismer der de blant annet bidrar til stabilisering av membranstrukturer. Enzymer som inngår i

dekarboksyleringsreaksjoner har pyridoxal- fosfat (aktiv form av vitamin B₆) som kofaktor. Ved biokjemisk klassifisering av blant annet enterobakterier og vibrio, inngår gjerne aminosyrene L-arginin, L-ornitin og L-lysin. Båkterier som produserer de aktuelle dekarboksylaser, vil danne basiske produkter som gir økt pH. Følgende grunnmedium ble benyttet: 5.0 g pepton, 5.0 g kjøttekstrakt, 0.5 g glukose, 5 mg pyridoxal, 1.5 g K₂HPO₄, 20 g NaCl, 10 ml mineral-saltløsning (M2.1) pr 1000 ml dest H₂O. pH ble justert til 7.5 før tilsats av 6 ml bromtymolblått (0.2%) og 2 ml cresolpurpur-rødt (0.2%). Mediet ble fordelt på dyrkingsrør (10 ml) og autoklavert før tilsats av sterilfiltrerte, pH justerte aminosyreløsninger (1% sluttkonsentrasjon). Rørene ble inokulert (2%) med en kultur dyrket på grunnmediet (OD₆₀₀=0.2), dekket med steril mineralolje og inkubert 1-8 dager ved 12°C. Seriene bestod av 4 rør pr bakterie - aminosyrene, samt en kontroll uten aminosyre. Positive reaksjoner (pH økning) var synlige ved fargeskift fra gult til fiolett. Kontroller og negative reaksjoner forble gule. Positive arginin reaksjoner ble testet med hensyn på ammoniakk i mediet (Nesslers reagens: 7 g KI, 10 g HgI₂, 10 g KOH pr 100 ml dest H₂O). Dersom ammoniakk kan påvises og organismen mangler urease, viser reaksjonene at arginin blir omsatt via arginin dihydrolasesystemet (ibid.). I dette metabolske sporet inngår enzymer som omsetter arginin til ornitin under dannelselse av ATP:



Indoldannelse.

En vanlig test ved klassifisering av bakterier er deres evne til omsetting av tryptofan til indol, pyruvat og ammoniakk ved hjelp av tryptofanase:



Kulturrør med tryptofanmedium (10 g pepton, 20 g NaCl, 0.4 g tryptofan pr 1000 ml godt uttappet springvann, pH 7.2) ble inokulert med bakterier fra fast medium (36 timer/blodagar) og inkubert 1-8 dager ved 12°C. Xylen ble benyttet for ekstraksjon av eventuell indol som danner en lyserød forbindelse ved tilsats av Ehrlichs-Bøhmes indol-reagens (0.4 g p-dimetylaminobenzaldehyd, 38 ml 96% EtOH, 8 ml 32% HCl). Testen ble også utført med Kovacs indolreagens (isoamylalkohol istedet for etanol).

Produksjon av ammoniakk fra urea.

Ureaseproduksjon ble testet på Christensens urea agar tilsatt 1.5% NaCl (1.0 g pepton, 20 g NaCl, 2.0 g KH₂PO₄, 1.0 g D-glukose, 20 g agar, 6 ml fenolrød-løsning (0.2%) pr 1000 ml dest H₂O). Mediet ble autoklavert i dyrkingsrør (9 ml) og avkjølt på vannbad til 50°C før tilsats av deionisert (Amberlite MB-3, Fluka AG, Sveits) 20% urealøsning (1 ml). Slutt-pH var 7.0. Skråagaren ble inokulert/podet med og uten

ureakontroll og inkubert 1-14 dager ved 12°C. Hydrolyse av urea (urease) vil gi en pH økning (ammoniakkproduksjon) synlig ved fargeendring i mediet.

Spalting av gelatin.

Bakterier ble podet på gelatinagar (2.7 g Nutrient broth, 5.0 g proteose pepton, 20 g NaCl, 10 ml mineralsaltløsning, 15.0 g agar, 5.0 g gelatin pr 1000 ml dest H₂O, pH 7.4). Etter inkubering 1-14 dager ved 12°C, ble gelatinspalting testet ved å helle kvikksølv-kloridløsning (15.0 g HgCl₂, 20 ml 32% HCl pr 100 ml dest H₂O) over agaren. Klar sone rundt koloniene viser spalting av gelatin (=positiv reaksjon). Ikke-hydrolysert gelatin dannet en hvit ugjennomskinnelig utfelling med HgCl₂-løsningen.

Stivelsesspalting (amylaseaktivitet).

Samme medium og betingelser som ved test for gelatin-spalting ble benyttet. Gelatin ble erstattet med løselig stivelse (Merck; 0.5% (w/v)). Som testløsning ble benyttet Grams iodløsning (se Gramreaksjon). Klar sone rundt koloniene indikerte amylase aktivitet.

Hydrolyse av tributyrin.

For å avdekke eventuell lipolyttisk aktivitet, ble bakteriene dyrket på tributyrin agar: TSA tilsatt 2.0% NaCl og 1.0% tributyrin (w/v) ("emulsjons-agar"; pH 7.3). Etter inkubering 2-14 dager ved 12°C medførte hydrolyse av tributyrin dannelse av en klarsone rundt koloniene.

Hydrolyse av Tween-forbindelser.

Bakteriene ble podet på Tween-agar (10.0 g pepton, 2.0 ml mineralsaltløsning, 20.0 g NaCl, 15.0 g agar, 10 ml Tween pr 1000 ml dest H₂O; pH 7.4) og inkubert 2-14 dager ved 12°C. Ugjennomskinnelige soner rundt koloniene (positiv reaksjon) er salter av frie fettsyrer og brukes som indikasjon på positiv lipolyttisk aktivitet. Siden Tween foreligger i løsning, er reaksjonen muligens et resultat av esteraseaktivitet; "lipase" forbeholdes de enzymer som virker på emulsifiserte substrater (HARRIGAN & McCANCE 1966). Tween 20 og 80 ble testet.

Luminescens.

Luminescerende bakterier er vanlig i det marine miljø. De finnes i sjøvann, på overflaten av- og i tarmsystemet hos marine dyr samt i spesielle lysorganer hos enkelte fisk og cephalopoder (REICHELDT & BAUMANN 1973; BAUMANN & BAUMANN 1981). Bakteriene ble dyrket ved 12°C på et basalmedium (M 2.3 b) tilsatt 0.3% (v/v) glycerol, 5 g/l gjærekstrakt, 5 g/l trypton, 1.0 g/l CaCO₃ og 15 g/l agar (LM-medium; BAUMANN & BAUMANN 1981). Platene ble undersøkt etter 24 og 48 timer. Øynene var på forhånd tilpasset mørket i minimum 5 minutter.

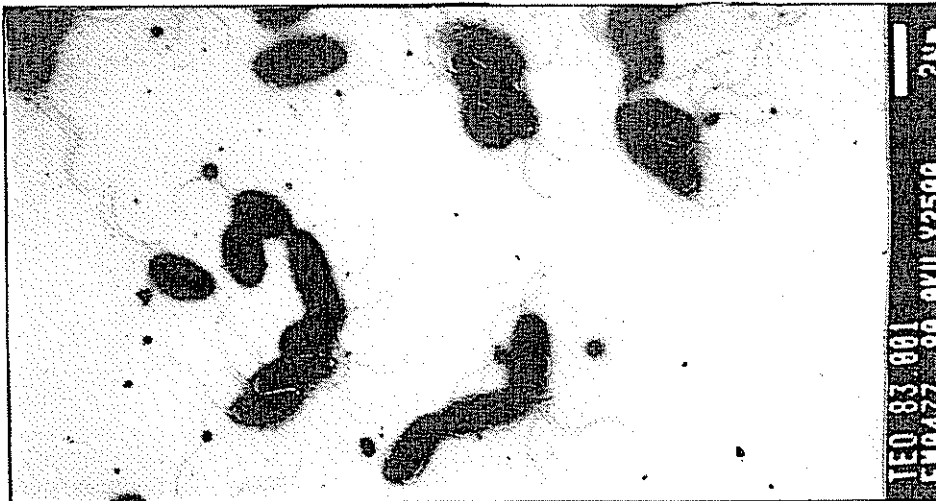
2.3 RESULTATER:

2.3.1 Morfologi, bevegelse og flagellering.

Det var ingen oppvekst av bakterier eller sopp på skåler med blodutstryk fra fisk uten symptomer på HS. Bakteriene som vokste opp etter utstryk fra fisk med HS var tilsynelatende renkulturer. Etter 30-72 timers vekst på blodagar dannet monokulturer av bakterier ved 12°C 0.5-1.5 mm runde, grålige (nærmest fargeløse), svakt gjennomskinnelige, konvekse kolonier med hel kant og glatt overflate. Koloniene var luktfrie, de løste seg lett i væske og bakteriene fordelte seg jevnt i løsningen.

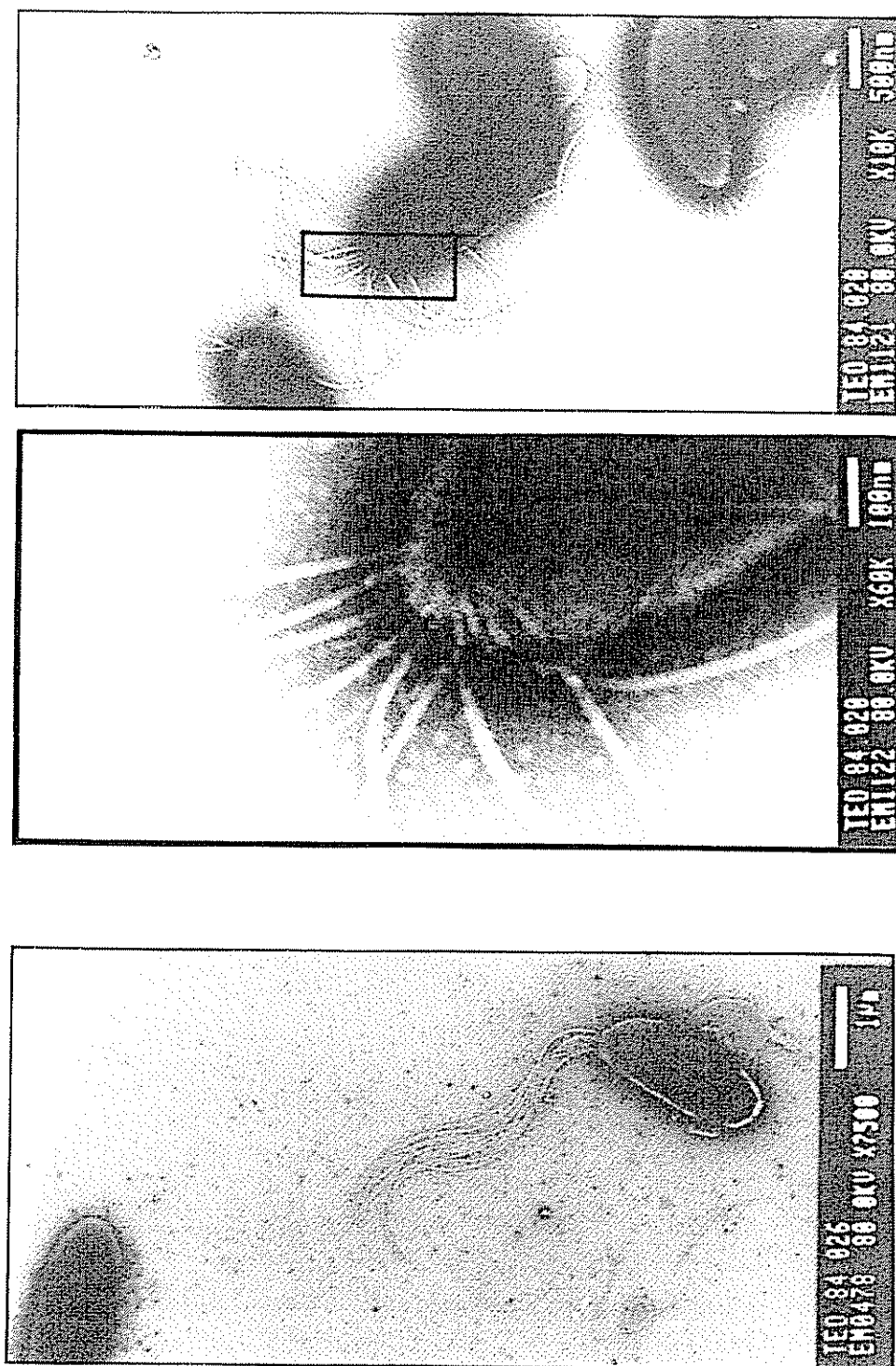
Den lett krummete ("vridde", kommaformete), stavformete bakterien var 0.5-0.8 µm bred og 1.0-3.0 µm lang (fig. 2.3). Kortere staver (tilnærmet runde) bakterier var ofte synlig i eldre kulturer og kulturer dyrket ved ugunstige betingelser som for eksempel lav pH. Bakterien var bevegelig (4-16°C) med inntil 10 polare flageller festet i en klynge i den ene enden av bakterien (fig. 2.4a, b og c). Flagellene var omgitt av et hylster ("sheath"). Bredden var 24-26 nm, hvorav kjernedelen utgjorde omlag 12-14 nm (fig 2.5 a og b). Bølgelengden ble anslått til 2.1-2.2 µm (fig. 2.3).

"Sverming" ble ikke observert ved dyrking på blodagar. Elektronmikroskopi-preparatene avslørte ingen laterale flageller eller fimbrier etter dyrking på flytende- og fast-medium.



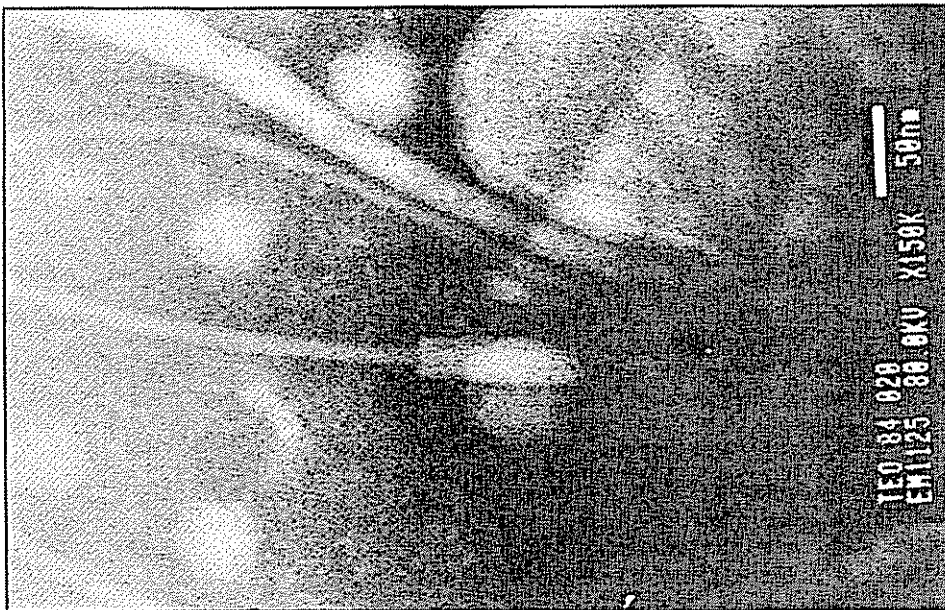
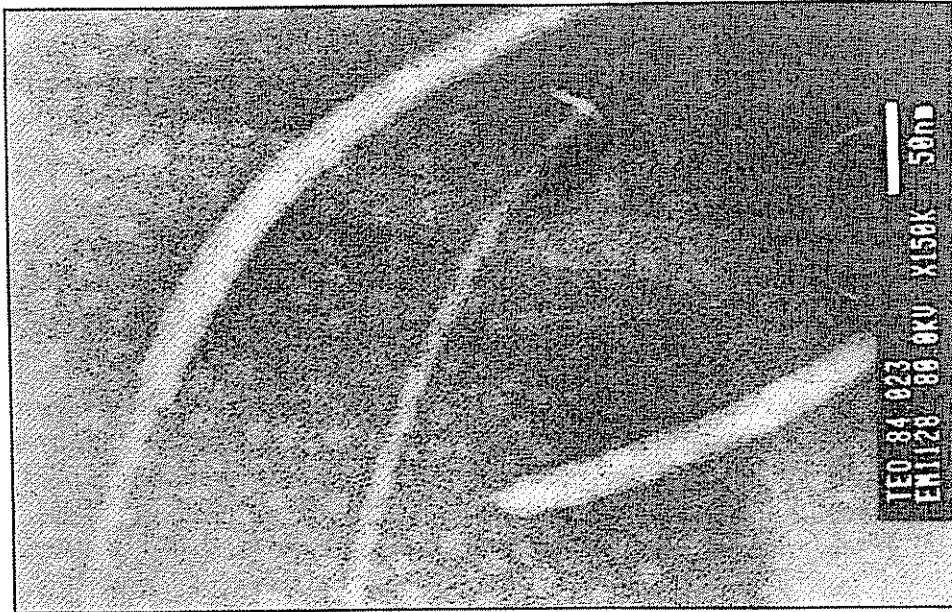
FIGUR 2.3: TEO-bakterier.

Vanlig antall flageller var mellom 1 og 4. Flagellenes bølgelengde er ut fra bildet anslått til 2.1-2.2 µm.



FIGUR 2.4: Multiflagellerte varianter av TEO-bakterier.

I preparater av samtlige TEO-bakterier kunne bakterier med flere enn 4 flageller påvises. På figuren er tatt med to eksempler som også viser at flagellene er plassert polart i en klynge.



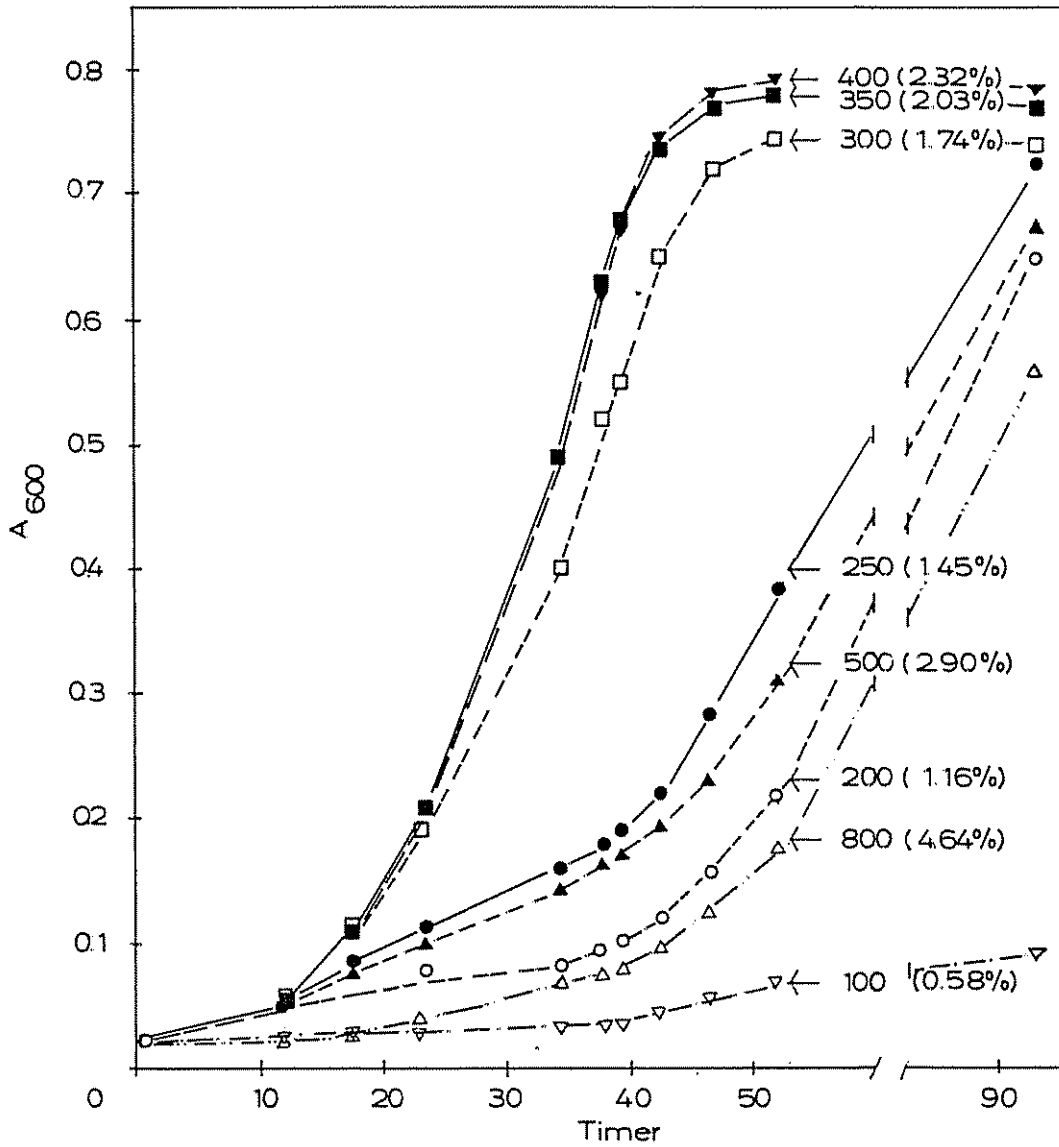
FIGUR 2.5: Flageller med "hylse" ("sheath"). Eksempler fra to forskjellige bakterier viser at flagellens ytre diameter med kappe er ca. 25 nm. Flagellkjernens diameter er av størrelsesorden 12-14 nm. Målestokk finnes på hvert av bildene.

2.3.2 Andre resultater.

Samtlige isolater var **Gram negative, oksydase- og katalase positive.** Fermentering av glukose resulterte i sure omsetningsprodukter uten synlig produksjon av gass. Endosporer eller kapsel ble ikke observert i den perioden arbeidet med bakterien pågikk. Samtlige isolater var sensitive overfor vibriostatisk reagens (0/129; krystaller), trimethoprim (100 ug), neomycin (30 ug), novobiocin (5 ug), tetracyclin (30 ug), streptomycin (30 ug) og polymyxin-B-sulfat, men resistent overfor penicillin G (10 ug).

TEO-bakteriene og *V. ordalii*-ene vokste ikke på minimalmedium (M2.3 a og b) med glukose (0-50 mM) som energikilde og NH_4^+ som eneste nitrogenkilde. Det samme var tilfelle med citrat som eneste energikilde (Simmons citrat-test) og for citrat som eneste energikilde i nærvær av organisk nitrogen (gjærekstrakt og cystein; Christensens citrat-test). Tilsats av gjærekstrakt (1.0 g/l) i glukose (10 mM)/ NH_4^+ -minimalmediene gav vekst. "Bacto Marine broth 2216" (Difco; "havsalter" tilsatt pepton og gjærekstrakt; pH 7.5) gav vekst. Bakterien vokste også på peptidfraksjonen (MW<10.000) av et fiske-innvolls-autolysat (FP-7.5; 10% (v/v) tilsatt destillert H_2O). "Bacto Brain Heart Infusion broth (BHI; Difco) tilsatt 1.5% NaCl gav ikke vekst (ved pH 7.3 og 7.8). TEO-bakteriene vokste ikke på MacConkey broth (Oxoid: gallsalter, pepton og laktose; tilsatt 1.5% NaCl og 2% Bacto agar; pH 7.3). Det samme var tilfelle for "Bacto PPLO agar" (Difco; Pepton og "fresh heart tissue"-ekstrakt tilsatt 1.5% NaCl; pH 7.8).

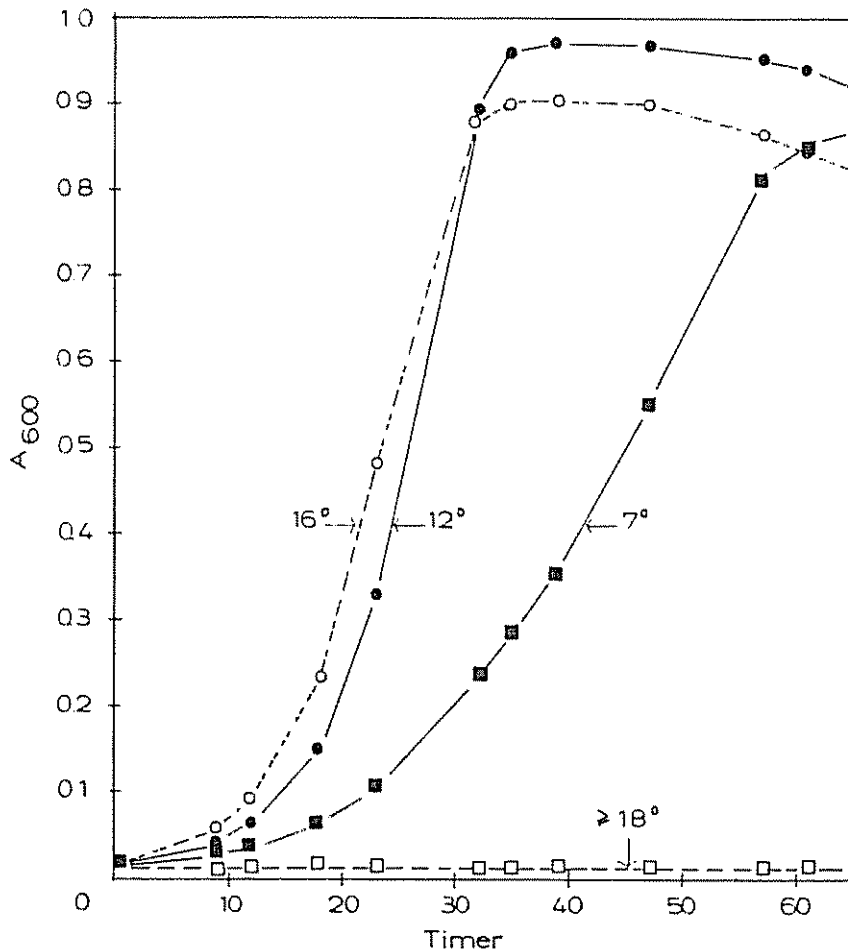
Ingen av bakteriene vokste i medier uten NaCl. TEO-bakteriene vokste i området 100-900 mM NaCl og hadde dermed et noe snevrere vekstområde sammenliknet med referansebakteriene. Den optimale NaCl-konsentrasjon for vekst ved 12°C lå i området 350-400mM. Figur 2.6 viser vekstforløpet av TEO 83.001-kulturer ved forskjellige NaCl konsentrasjoner.



FIGUR 2.6: Vekst ved forskjellige NaCl-konsentrasjoner.

TEO 83.001 ble dyrket aerobt ved 12°C på et modifisert MB-medium ("Marine broth", se pkt. 2.2.7 i materialer og metoder). Kulturene (to paralleller) ble inokulert (3%) med celler i eksponensiell vekstfase, dyrket på 300 mM NaCl.

Alle bakteriene vokste ved 4, 7, 12 og 16°C. Optimal temperatur for TEO-bakteriene lå i området 12-16°C, maksimumstemperaturen omkring 18°C. Det var antydning til vekst på blodagar ved ca. 18°C. Kontrolltest av to flytende TEO-kulturer (HI-7751 og TEO 83.001; HS-TEO-medium tilsatt 10% FP-7.5) gav ingen vekst ved 18.0°C (figur 2.7).

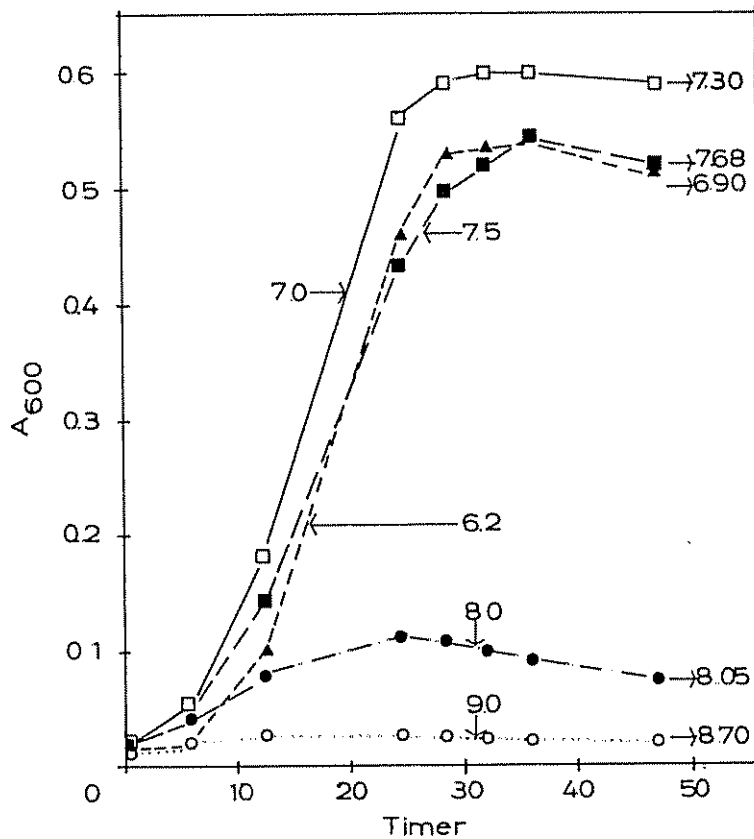


FIGUR 2.7: Vekst ved forskjellige temperaturer.

Figuren viser TEO 83.001's vekstforløp ved forskjellige temperaturer (vist på figuren). Cellene er dyrket på HS-TEO medium tilsatt 10% "fiskeprotein" (FP-7.5, (v/v); se kap. 2.2.1). Kulturene (to paralleller) ble inokulert (4%) med celler i eksponensiell vekstfase dyrket på samme medium ved 16°C.

Ingen av TEO-bakteriene vokste ved pH 9. All vekst syntes å stoppe ved pH 8. Forsøk på å tilsette svak syre (pH justert ned 0.6-0.8 pH-enheter) i kulturer som "flatet ut" omkring pH 8, gav ytterligere vekst. Figur 2.8 bekrefter en øvre pH-grense omkring 8

i tilfelle TEO 83.001. I vekstforsøk med begrenset O_2 -tilgang og glukose i mediet, stoppet all vekst i pH-området 5.1-5.5. Dette forklarer at metylrødt-testen var negativ (positiv når $pH < 4.5$).



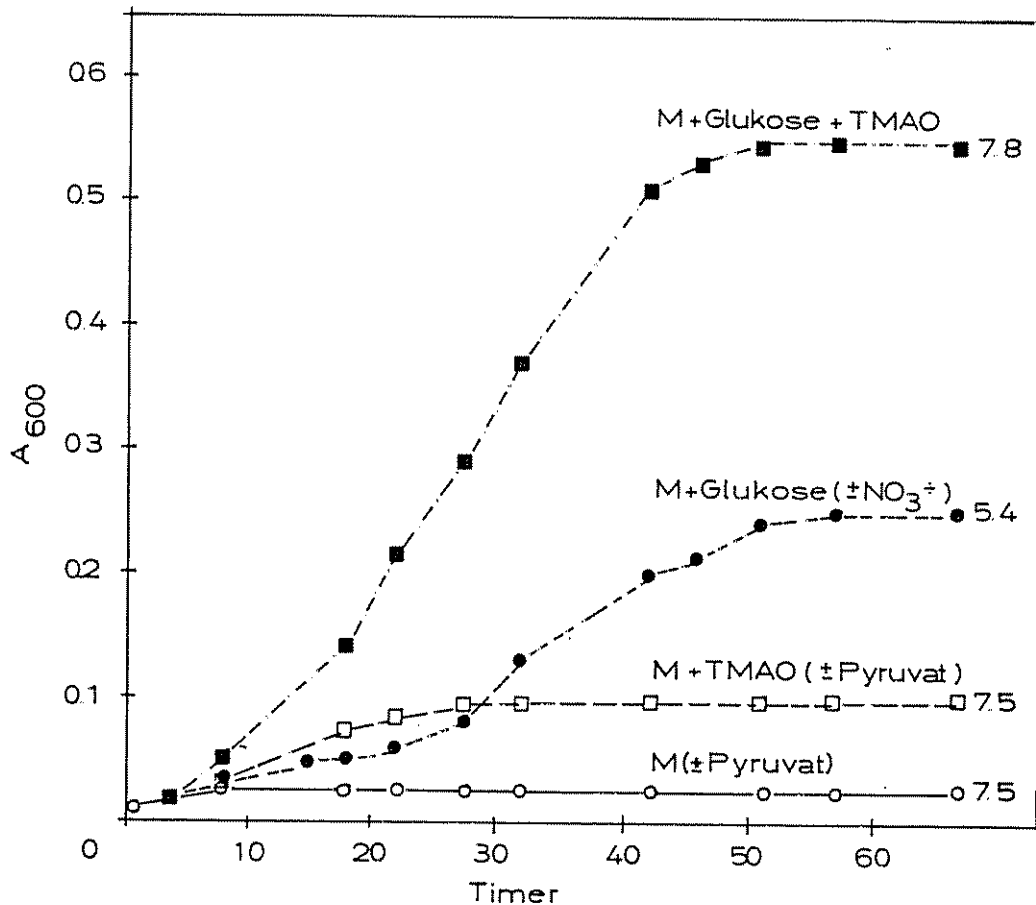
FIGUR 2.8: Vekst ved forskjellige pH-verdier.

TEO 83.001 ble dyrket aerobt ved $12^{\circ}C$ på MB-medium ("Marine broth", Difco) tilsatt 100 mM Tris-HCl. Ved enden av hver kurve er ført opp pH i de utvokste kulturene. Kulturene (to paralleller) ble inokulert (5%) med celler i eksponensiell vekstfase, dyrket ved pH 7.0.

Av figuren ser en at ved pH 7.0 og 7.5 starter veksten umiddelbart. Mediet med start-pH 6.2 resulterte i en lag-fase. I tidlig eksponentiell fase var pH økt til 6.5, og ved stasjonærfasens begynnelse (28.5 h) ytterligere økt til 6.7. På bakgrunn av disse resultatene synes TEO 83.001's optimale pH-område for vekst ved $12^{\circ}C$, å ligge i området 6.5-7.5. Lakseblod har normalt en pH rundt 7.5 (noe lavere i fisk med HS). pH-området 7.0-7.5 er derfor valgt som "arbeidsområde".

NO_3^- ble ikke redusert av TEO-bakteriene, og det samme gjaldt de to testete *V. ordalii*-stammene. NO_3^- gav ingen stimulert vekst av TEO 83.001. Trimetylammin oksyd (TMAO) stimulerte derimot anaerob vekst av TEO 83.001 (figur 2.9) og *V. anguillarum* NCMB 6. Sammenliknet med medium tilsatt bare glukose (5 mM), ga

tilsetning av TMAO (50 mM) i tilfelle TEO 83.001 en vekstøkning på mer enn det dobbelte. For NCMB 6 var vekstøkningen omlag 50%.



FIGUR 2.9: Vekstforløp under anaerobe betingelser med og uten trimetylamino oksyd (TMAO).

TEO 83.001 ble dyrket ved 12°C i kultiveringsrør (med slipte glasskorker). Hver kurve er påført de forskjellige tilsetninger utover grunnmediet (M; se pkt. 2.2.7 i materialer og metoder). Følgende konsentrasjoner ble benyttet: glukose 5 mM, pyruvat 10 mM, TMAO 50 mM og NO₃⁻ (Na⁺-salt) 50 mM. Kulturene (to paralleller) ble inokulert (3%) med celler i eksponensiell vekstfase dyrket på grunnmedium tilsatt gjærekstrakt. Ved enden av hver kurve er påført pH i de utvokste kulturene.

Ingen av de karbohydrater som ble omsatt fermentativt gav synlig produksjon av gass. TEO-bakteriene produserte syre ved omsetning av glycerol, ribose, D-fruktose, D-galaktose, glukonat, D-glukose, D-mannitol (mannit), D-mannose, D-cellobiose, gentio-

biose, trehalose og N-acetyl-glukosamin, men ikke syre fra blant andre sukrose, D-maltose, stivelse (glykogen og amidon) og testete glukosider (en rekke andre ikke-fermentative C-kilder er listet i tabell A 2.1 (Appendiks I). I denne sammenheng kan det være på sin plass å nevne at vekstforsøk med TEO 83.001 med medier tilsatt glukose, fruktose, galaktose og ribose viste at slutt-pH (5.2) ble lavest etter vekst på glukose. Tilsvarende tall for de øvrige sukkerer var 6.45 (fruktose), 7.85 (galaktose) og 7.30 (ribose). Ved vekst på galaktose var pH aldri under 7.0. Grunnmedium var HS-TEO (M 2.2).

I tabell 2.1 er listet opp noen sentrale egenskaper for sammenlikning med andre bakterier innen gruppen *Vibrio*. Sentralt blant karbohydratene står gentiobiose som fermenteres (forsinket) av TEO-bakterier, men ikke *Vibrio anguillarum* og *V. ordalii*. De to sistnevnte fermenterer sukrose og D-maltose. Med unntak av to bakterier (B1 og B6), som ga forsinket fermentering av maltose, er begge disse egenskapene negative hos type-TEO-bakterier. I motsetning til *V. ordalii*, produserte både *V. anguillarum* og TEO-bakterier syre fra glycerol, glukonat, D-mannose, D-cellobiose og trehalose (ett unntak var NCMB 2129 som ikke fermenterte trehalose. Dette resultatet er i overenstemmelse med EGIDIUS & ANDERSEN (1977)).

TABELL 2.1 Sammenlikning av fenotypiske egenskaper ved bakterier fra gruppen *Vibrio*.

	<i>Vibrio anguillarum</i> (n=9)	<i>Vibrio ordalii</i> (n=2)	TED bakterier (n=20)	<i>Vibrio marinus</i> (n=1) 1)	<i>Vibrio logeii</i> (n=11) 1)	<i>Vibrio fisheri</i> (n=12) 1)	<i>Vibrio ordalii</i> (n=5) 1)
Utsmøring	-	-	-	-	-	-	-
Utsmøring regelmessig (12°C)	+	+	+	+	+	+	+
Utsmøring:							
flytende medium	P a)	P	P	P	P	P	P
fast medium	P	P	P	P	P	P	P
3-12 flageller	-	-	+	-	+	+	+
Polarstaver	-	-	-	+	+	+	d
Polarorientering	-	-	-	+	+	+	-
Lipase (Kovacs)	+	+	+	+	+	+	+
Fermentativ (glukose)	+	+	+	+	+	+	+
Utsmøring fra glukose	-	-	-	-	-	-	-
Utsmøring til organiske vekstfaktorer	-	+	+	+	d	-	+
Pigment	-	-	-	-	+	+	-
Nitrat-Proskaauer	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat fra pyruvat	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat (basisk reaksjon)	+	-	-	+	+	+	-
Nitrat dekarboksylase	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat dekarboksylase	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat fra tryptofan	+	(8/9)	-	-	-	-	-
Nitrat, Simmons	+	(8/9)	-	-	-	-	-
Nitrat, Christensen	+	b)	-	-	-	-	-
Reduksjon av NO ₃ ⁻ til NO ₂ ⁻	+	-	-	+	+	d	-
Reduksjon av TMAO til TMA	+	c)	+	e)	-	+	+
Nitratase	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat	-	-	-	-	-	-	+
Nitrat hydrolyse	+	-	-	+	-	-	-
Nitrat hydrolyse	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat hydrolyse	+	V	-	(-) f)	-	-	-
Nitrat (human-blod)	+	V	-	-	-	-	-
PG (beta-galaktosidase)	+	-	-	-	-	-	-
Nitratase	-	-	-	-	-	-	-
Nitratase (tributyrin)	+	-	-	+	d	+	-
Nitratase 20 og 80	(+)	-	-	-	-	-	-
Fermentering/utnyttelse av:							
Arabinose	-	(7/9)	-	-	-	-	-
Cellulose	+	(8/9)	+	-	+	+	-
Galaktose	+	+	(+) g)	-	+	+	-
Inositol	-	-	+	-	-	-	-
Laktose	+	-	+	+	+	+	+
Mannitol	+	-	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	h)	+	+	-
Mannitol	+	-	+	-	-	-	-
Mannose	+	-	+	-	d	+	-
Ribiose	-	(5/9)	-	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	+	d	-	-
Sorbitol	-	(6/9)	-	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	-	-	-	-
Sorbitol	+	(8/9)	+	-	-	d	-
Nitrat							
ved 4°C	+	+	+	+	+	-	-
ved 18°C	+	+	(+)	+	(20°C)	+	(20°C)
ved 30°C	+	+	-	-	-	-	-
ved 37°C	(+)	-	-	-	-	d (35°C)	-
Nitrat							
uten NaCl	-	-	-	-	-	-	-
0.5% NaCl	+	+	(+)	+	+	+	+
2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
7.0% NaCl	(+)	-	-	-	-	-	-
Nitrat							
på McConkey agar	+	-	-	-	-	-	-
BHI-NaCl medium	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat							
ved pH 9	(+)	-	-	-	-	-	-

) Etter BAUMANN et al. 1984

- a) P=polar, L=lateral
- b) Testet NCMB 6, NCMB 2129 og A3.1
- c) OLAFSEN et al. 1975
- d) egenskapen varierer innen gruppen
- e) Undersøkt for TED 83.001 (figur 2.9)
- f) To av bakteriene (B1 og B4) muligens positive i API 50 CH.
- g) Samtlige positive (syreproduksjon) etter 18 timer, men fikk i API 50 CH systemet omslag til basisk pH ved ytterligere inkubering. Dette skjedde ikke med *V. anguillarum* eller *V. ordalii*.
- h) To bakterier gav omslag etter 6-7 døgns inkubasjon.

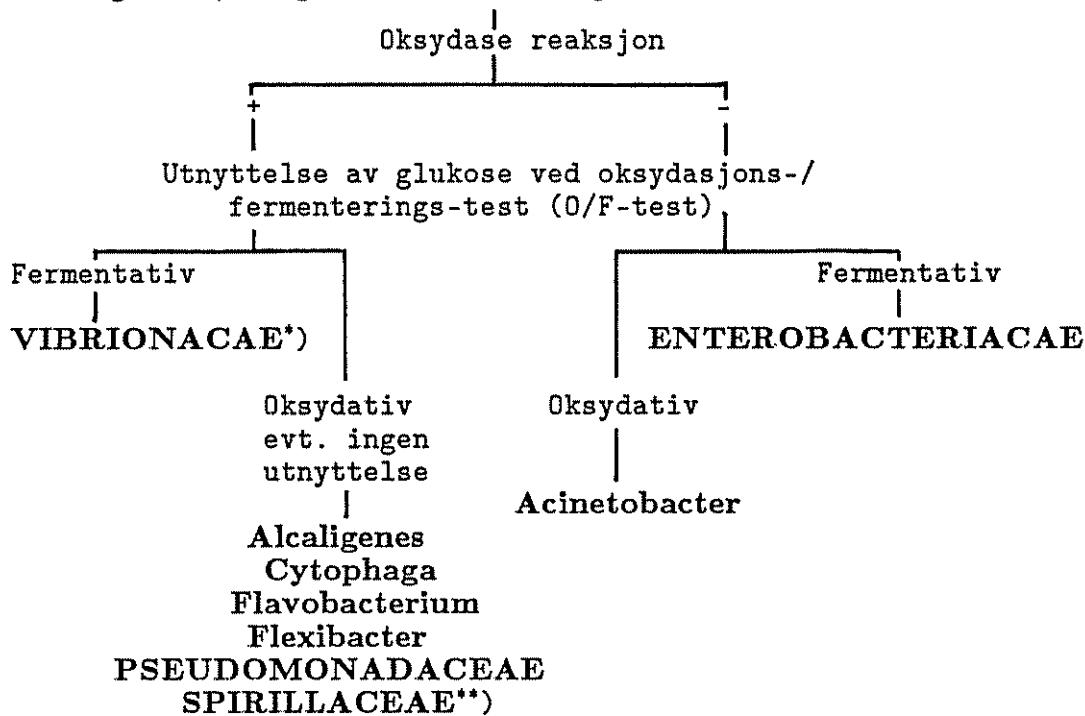
+ = positiv reaksjon
 (+) = positiv under tvil
 - = negativ reaksjon
 = ikke undersøkt

(x/n) indikerer x pos./neg. av totalt n bakterier

2.4 DISKUSJON.

2.4.1 Innledende tester.

Ikke-sporedannende, Gram negative, stavformete bakterier som naturlig forekommer i akvatiske omgivelser, kan grovt deles inn slik figur 2.10 viser.



FIGUR 2.10: Skjema for "screening" av G-, ikke sporedannende bakterier som er vanlige i akvatiske miljø (etter WEST&COLWELL 1984).

*) *V. metschnikovii*, *V. gazogenes* og *Photobacterium phosphoreum* er oksydase negative.

**) Endringer i klassifisering foretatt i senere år (KRIEG 1984) gir ingen endringer av figuren.

Samtlige testete kolonier som vokste opp fra fisk med HS var oksydase positive og fermenterte glukose, noe som plasserer bakteriene i familien *Vibrionaceae*. En slik plassering styrkes av bakteriens sensitivitet for vibriostatisk reagens, kravet om NaCl for vekst og at polare flageller var omgitt av en hylse ("sheath"). Familien *Vibrionaceae* kan deles inn i 4 bakteriegrupper (genus): *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* og *Plesiomonas* (BAUMANN & SCHUBERT 1984). *Aeromonas* og *Plesiomonas* vokser uten Na⁺ (i motsetning til de to andre; BAUMANN et al. 1980). Sammen med gruppen *Photobacterium*, mangler de dessuten det hylsteret rundt eventuelle polare flageller som er typisk for gruppen *Vibrio* (Ibid.). En tredje karakteristikk som synes egnet for å skille mellom de fire gruppene, er utnyttelse av D-mannitol (BAUMANN & SCHUBERT 1984): *Photobacterium* og *Plesiomonas* omsetter ikke D-mannitol; egenskapen forekommer i begge de andre gruppene. På

denne bakgrunn synes det riktig å plassere TEO-bakteriene i gruppen *Vibrio*. Dersom TEO-bakterienes sensitivitet for novobiocin tas med, er også kravene til LEVIN et al. (1972) tilfredstilt for plassering i rekken av marine *Vibrio*.

2.4.2 Sentrale egenskaper ved gruppen *Vibrio*.

1984-utgaven av "Bergey's manual of systematic bacteriology" (vol 1) behandler 20 arter innen gruppen *Vibrio*. I tillegg er publisert *V. damsela* (LOVE et al. 1982), *V. diazotrophicus* (GUERINOT et al. 1982), *V. hollisae* (HICKMAN et al. 1982) og *V. mimicus* (DAVIS et al. 1981). Bakterier som tilhører gruppen *Vibrio* er gram negative og stavformete med varierende størrelse og morfologi (pleomorf). Bakteriene er vanligvis "kommaformete" (vibrione) og beveger seg ved hjelp av en eller flere polare flageller. Flagellene er omsluttet av et hylster ("sheath") som henger sammen med yttermembranen i bakteriecelleveggen (BAUMANN et al. 1984). Normal tykkelse på de polare flagellene er 24-30 nm med en bølgelengde i området 1.4-1.8 μm . De fleste *Vibrio* har en polar flagell, men kan i enkelte tilfeller forekomme med inntil 3 flageller (BAUMANN et al. 1980; CHART 1983). *V. fisheri* og *V. logei* skiller seg imidlertid fra de øvrige ved at flagellene forekommer i en klynge på inntil 12, med en bølgelengde omkring 3.6 μm (BAUMANN et al. 1984). Enkelte *Vibrio*-arter danner laterale flageller uten hylster når de vokser på fast-medium. Denne flagell-typen kan forekomme i antall på over 100 per celle og antas å ha betydning ved festing til overflater. Bølgelengden er oppgitt til 0.9 μm (ibid.). Sentrale biokjemiske karakteristika for gruppen er krav til Na^+ i vekstmediet, fermentering av glukose uten gassdannelse, positiv oksydaseresaksjon og følsomhet for vibriostatisk reagens (0/129; 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridin; WEST & COLWELL 1984). Det er imidlertid rapportert tilfeller av 0/129-resistens: MUROGA et al. (1979) fant resistente *V. anguillarum*-stammer i laksefisk (*Plecoglossus altivelis*), sansynligvis som følge av forebyggende antibiotikabehandling (trimethoprim-sulfadoxin). Tilsvarende resultater er rapportert av AOKI et al. (1981) som undersøkte resistens mot 0/129 og trimethoprim. Det er også rapportert tilfeller av 0/129-resistente stammer av *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* (KENT 1982) og *V. cholerae* (SUNDARAM & MURTHY 1983;). SUNDARAM & MURTHY (1983) fant en sammenheng mellom 0/129- og trimethoprim-resistens hos *V. cholerae*. 0/129-resistente stammer var imidlertid følsomme for novobiocin (ibid.).

Elektronmikroskopi-preparater av *V. anguillarum* og *V. ordalii* viste polare flageller med bølgelengder i området 1.3-1.4 μm , altså i overensstemmelse med litteraturen (1.4-1.8 μm). Ut fra denne "målestokken", synes bølgelengden på TEO-flageller å befinne seg mellom vanlig *Vibrio*- (1.4-1.8 μm) og de mer spesielle *V. logei*/*V. fisheri*-flagellenes bølgelengder (3.6 μm). Sistnevnte to bakterier danner imidlertid pigmenterte (gul-orange) kolonier ved vekst på rikt fast-medium (BAUMANN et al. 1980), noe som skiller dem fra TEO-bakteriene.

Et sentralt trekk ved plassering av TEO-bakteriene, er deres krav til organiske vekstfaktorer. De fleste *Vibrio*-bakterier krever ikke organiske vekstfaktorer. Unntak er *V. ordalii*, *V. marinus* samt noen bakterier blant typene *V. logei*, *V. cholerae*, *V. metschnikovii* og *V. costicola* (BAUMANN et al. 1978; BAUMANN et al. 1980;

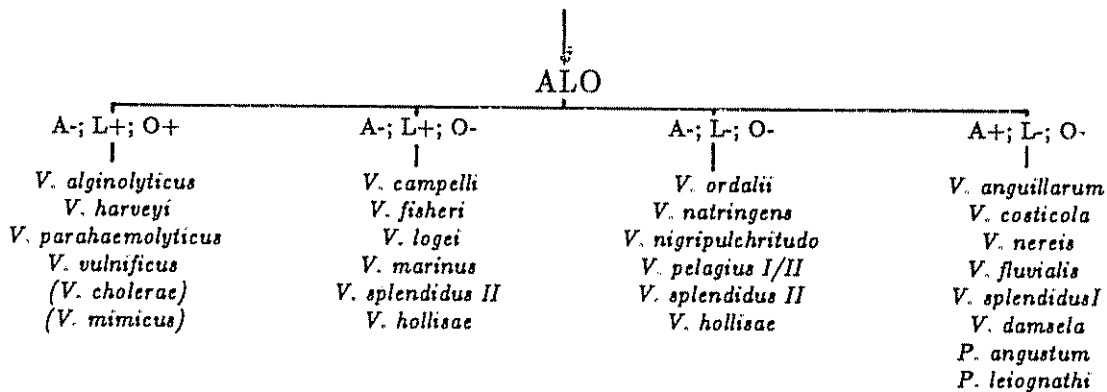
BAUMANN et al. 1984). De tre sistnevnte er lite aktuelle kandidater på grunn av Na^+ -krav klart forskjellig fra TEO-bakteriene (BAUMANN et al. 1980). *V. logei* er som tidligere nevnt pigmentert og dermed en lite aktuell art med tanke på plassering av TEO-bakteriene. Av kjente *Vibrio*-bakterier med krav til organiske vekstfaktorer gjenstår dermed bare *V. ordalii* og *V. marinus*.

I følge BAUMANN et al. (1984), har *V. marinus* evne til å redusere NO_3^- . BAUMANN et al. (1980, 1984) nevner 3 *Vibrio*-bakterier som ikke reduserer NO_3^- ; *V. metschnikovii*, *V. gazogenes* og *V. ordalii*. De to førstnevnte er oksydase negative, *V. gazogenes* produserer i tillegg gass ved fermentativ omsetning av glukose (ibid.). Dermed gjenstår bare *V. ordalii*. SCHIEWE et al. (1981) fant imidlertid 6 *V. ordalii* bakterier som reduserte NO_3^- . De øvrige 5 av totalt 11 testete bakterier vokste ikke på det aktuelle NO_3^- -medium. Det synes derfor som om manglende evne til NO_3^- -reduksjon ikke er felles for alle *V. ordalii*-bakterier. Manglende evne til nitrat-reduksjon blir dermed et vesentlig karaktertrekk ved type-TEO-bakterier. Som tidligere nevnt var samtlige av de 20 testete bakteriene negative med hensyn på denne egenskapen.

Bakterier som har det enzym-kompleks som kreves for å redusere NO_3^- (nitrat reduktase) har vanligvis også evnen til å redusere trimetylamin oksyd (TMAO; STRØM pers. medd. 1985). Det finnes imidlertid eksempler på at nitrat-reduserende bakterier mangler TMAO-reduktase komplekset (Ibid.). Ved vekstforsøkene som danner grunnlaget for figur 2.9, ble det ikke målt konsentrasjoner av omsetningsprodukter som for eksempel acetat. Det er derfor vanskelig å si sikkert hvorvidt TEO 83.001 virkelig har det aktuelle enzymesystemet. Den klare vekstøkningen som ble registrert, indikerer imidlertid at en her har et eksempel på en bakterie som har TMAO-reduktase, men mangler nitrat-reduktase.

Dekarboksylering av aminosyrene arginin, lysin og ornithin synes å være egenskaper vel egnet til å skille mellom bakterier innen familien *Vibrionaceae* (WEST & COLWELL 1984). Figur 2.11 viser hvordan forskjellige *Vibrio*-bakterier kan deles inn i grupper på bakgrunn av egenskaper knyttet til de tre aminosyrene: basisk reaksjon ved omsetning av arginin (arginin dihydrolase), lysin- og ornithin dekarboksylase (se kapittel 2.3.7).

Blant *Vibrio*-bakteriene med krav til organiske vekstfaktorer, er det kun *V. ordalii* som, i likhet med TEO-bakteriene, er negativ med hensyn til alle disse tre egenskapene. Som tidligere nevnt, er det imidlertid mulig å skille klart mellom *V. ordalii* og TEO-bakterier på bakgrunn av sukkerfermenterings-testene.



- *) A: arginin dihydrolase
 L: lysin dekarboksylase
 O: ornithin dekarboksylase

FIGUR 2.11: Skjema for innledende identifikasjon av bakterier innen familien *Vibrionaceae*.

2.4.3 *Vibrio*-bakterier forbundet med sjukdom hos fisk.

Blant marine *Vibrio*-bakterier forbundet med sjukdom hos fisk, har *V. anguillarum* tradisjonelt stått sentralt. Alt før århundreskiftet ble bakterien isolert i forbindelse med sjukdomsutbrudd hos ål (*Anguilla anguilla*) og derfor gitt navnet *Bacillus anguillarum* (CANESTRINI 1892). På bakgrunn av bakteriens likhetspunkter med *V. cholerae* foreslo BERGMAN (1909) navnet *Vibrio anguillarum*. Biokjemiske variasjoner blant *V. anguillarum*-stammer fra forskjellige deler av verden, har opp gjennom årene avstedkommet flere forslag til bio-varianter (biotyper) av bakterien (BERGMAN 1912, NYBELIN 1935, SMITH 1961, EVELYN 1971, SCHIEWE et al. 1977). Omkring midten av 70-tallet ble *V. anguillarum*-liknende bakterier beskrevet i USA og Japan (HARREL et al. 1976, OHNISHI & MUROGA 1976). Bakterien fikk betegnelsen *V. anguillarum* biotype II (biovar II), men ble senere skilt ut som egen art: *V. ordalii* (SCHIEWE et al. 1981; SCHIEWE 1982). Begge disse bakterie-typene

forårsaker vibriose, men synes som tidligere nevnt (kap 1), å ha forskjellige spredningsmønstre i angrepet fisk (RANDSOM et al. 1984, SCHIEWE et al. 1983).

De senere år har listen over *Vibrio*-bakterier som kan framkalle sykdommer hos fisk blitt lengre (Tabell 2.4; COLWELL & GRIMES 1984; AUSTIN & ALLEN-AUSTIN 1985). Flere av disse (*Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* 2) kan framkalle sykdom også hos mennesker.

TABELL 2.2: *Vibrio*-bakterier som har vist seg å kunne framkalle sykdom hos fisk *).

Organisme:	Sjukdomsbilde:
<i>V. alginolyticus</i>	sårdannelse
<i>V. anguillarum</i>	vibriose (klassisk)
<i>V. carchariae</i>	"vasculitis"
<i>V. cholerae</i> non-01	punktformige blødninger
<i>V. damsela</i>	hud-skader
<i>V. ordalii</i>	vibriose (klassisk)
<i>V. parahaemolyticus</i>	sårdannelse
<i>V. vulnificus</i> 2	hud-skader

*) Etter COLWELL&GRIMES (1984).

Som en oppsummering av dette kapitlet, er det på sin plass å presentere de egenskapene som skiller denne *Vibrio*-bakterien (TEO) fra øvrige kjente bakterier i gruppen.

Vibrio sp. TEO er polart flagellert med 2-10 flageller samlet i en "klynge". Den krever organiske vekstfaktorer, og er istand til å utnytte gentiobiose, cellobiose, trehalose, glukonat, mannose og mannitol. (Den er også istand til å redusere trimetylaminoksyd (TMAO)). *Vibrio* sp. TEO er negativ med hensyn til følgende egenskaper: Reduksjon av NO_3^- , vekst ved pH 9, vekst ved temperaturer over 18°C , arginin dihydrolase, lysin- og ornithin-dekarboksylase, hydrolyse av gelatin og (løselig) stivelse. Den er ikke pigmentert, og ikke i stand til å fermentere sukrose.

Resultatene fra dette kapitlet viser at *Vibrio* sp. TEO-bakteriene tilhører en psykrofil *Vibrio*-type som tidligere ikke er beskrevet.

KAPITTEL 3. SEROLOGISK KARAKTERISERING AV BAKTERIER.

3.1 Innledning.

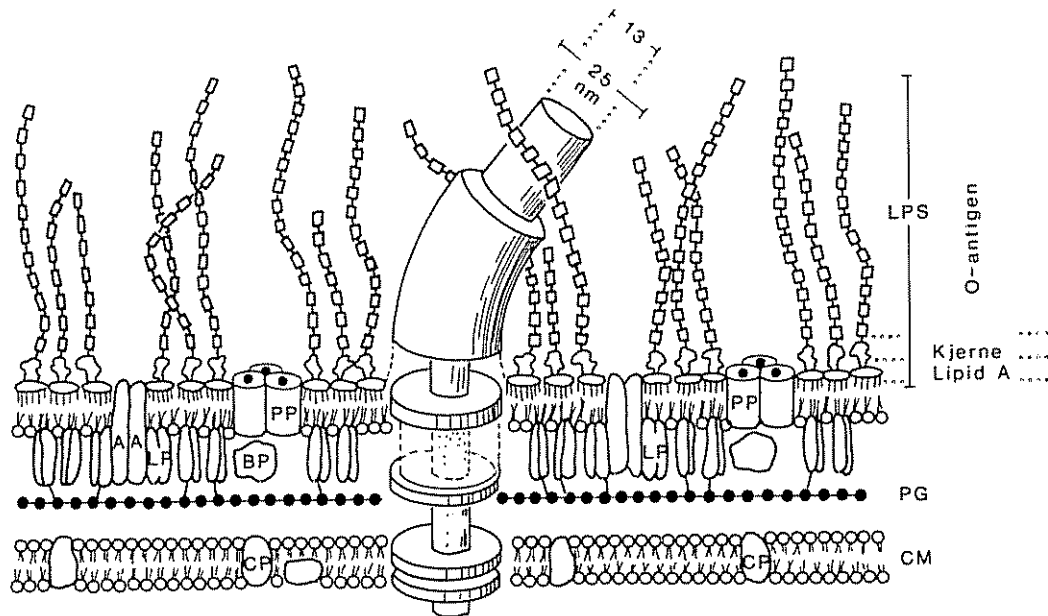
Tidligere har klassifisering av bakterier vært basert på forskjeller og likheter i en rekke fysiologiske og morfologiske karakteristika. Det synes imidlertid klart at slike biotypiske (fenotypiske) karaktertrekk som **eneste metode** for å skille mellom bakterier er av begrenset verdi (CRICHTON & OLD 1979; OLD et al. 1980). **Serologi** er studiet av reaksjoner mellom **antistoffer** (Ab) og **antigener** (Ag). Ved bruk av serologiske metoder ved klassifisering av bakterier, søker en å avdekke bakteriecellens ytre molekylære arkitektur. Slik metoden tenkes anvendt, er den avhengig av de **antigene egenskaper** ved bakteriens ytre strukturer. Med antigene egenskaper menes den evne disse strukturene har til å forårsake antistoffproduksjon i levende dyr, for eksempel kanin.

Når bakterier av en bestemt type injiseres i en kanin, vil kaninens indre forsvar "se" fremmedelementene (non-self) og produsere antistoffer mot molekyler på bakterieoverflaten. Antistoffene er spesialiserte proteiner (immunglobuliner=Ig) som reagerer med ett antigen, eventuelt med strukturelt like antigener. De delene av antigenmolekylet som bindes til antistoffene ved slike Ag-Ab reaksjoner, kalles **antigene determinanter** eller epitoper. Forskjellige determinanter gir opphav til antistoffer med forskjellige spesifisiteter. Et **antiserum** fra en kanin vil følgelig inneholde en blanding av antistoffer som er spesifikke for en rekke determinanter på overflaten av bakterien. Med utgangspunkt i kjente antisera kan en gjennom serologiske reaksjoner karakterisere og gruppere bakteriene på bakgrunn av hvilke overflatemolekyler de uttrykker. Ved å teste bakterier mot forskjellige antisera, vil en dermed få et **serologisk mønster** som uttrykker noe om bakterienes "ytre" slektskap.

Antigene strukturer på overflaten av Gram negative bakterier.

Tre lag avgrenser det indre av en Gram negativ bakterie fra verden utenfor: **cytoplasma-** (inner-) **membranen**, **peptidoglykan-** eller **murein-laget** og **yttermembranen**. Mellom membranene finner det såkalte periplasmiske rom med sine proteiner og oligosakkarider (LUGTENBERG & vanALPHEN 1983) som hos *E. coli* kan utgjøre opptil 20-40% av det totale cellevolum (STOCK et al. 1977).

Yttermembranen hos Gram negative bakterier består i hovedsak av **lipopolysakkarider (LPS)**, **proteiner** og **fosfolipid**. Forholdet mellom disse varierer noe avhengig av både bakterieart (og gruppe), vekstbetingelser og den vekstfase bakterien befinner seg i (LUGTENBERG & vanALPHEN 1983). LPS som er karakteristisk for Gram negative bakterier, består av en hydrofob, biologisk aktiv del (endotoksin, lipid A) og en ofte forgreinet hydrofil sukker-del (MORRISON & ULEVITCH 1978; McCABE 1980; LUDERITZ et al. 1982).



FIGUR 3.1: Skjematisk framstilling av yttermembranens molekylære organisasjon (hos enterobakterier; etter BROCK et al. (1984) og LUGTENBERG & vanALPHEN (1983)). Lipopolysakkarider (LPS) og fosfolipid molekyler utgjør hovedbestanddelene i det asymmetriske (doble) ytterlaget. Tre proteintyper er antydnet: poreprotein (PP), yttermembranprotein (A) og lipoprotein (LP). O-antigen kjeder kan være mye lengre enn antydnet på tegningen. BP står for bindingsprotein. Peptidoglykanlaget (PG) og cytoplasmamembranen (CM) med transportprotein (CP), inngår også.

Sukkerdelen er den serologisk mest interessante og består av en kjerne-del (R-antigener) som vanligvis fortsetter i en polymer av repeterende karbohydratenheter (O-antigener). Antall repeterende enheter i karbohydratkjedene kan variere. Hver enhet kan være forgreinet og bestå av et varierende antall, oftest forskjellige suktermolekyler. Når i tillegg disse kan være bundet sammen via ulike bindingstyper, avspeiler dette noe av grunnlaget for den store O-antigen variasjonen en finner hos Gram negative bakterier (JANN et al. 1975; ROSNER et al. 1979; PALVA & MAKELA 1980; TSAI et al. 1983). Med grunnlag i disse varmestabile (100°C) O-antigenene, inndeles bakterier i O-serotyper (eller O-serovarianter). Avhengig av sukkerpolymerens lengde, betegnes LPS som type S (smooth; lang kjede) eller R (rough; kjernedelen, eventuelt bare deler av denne). Varierende vekstbetingelser kan forårsake variasjoner i LPS-sammensetning (TSAI et al. 1983). Det er ikke uvanlig at høyvirulente bakterier har felles O-antigener (MITTAL et al. 1980). Dette betyr imidlertid ikke at alle bakterier innenfor denne serotypen er virulente (DONOVAN 1984).

Yttermembranen hos Gram negative bakterier kan, som hos en del *E. coli*-arter, være dekket av et uregelmessig kapsel-lag (K-antigener). Laget består vanligvis av negativt ladete polysakkarider (LUGTENBERG & VANALPHEN 1983) som gir opphav til stor antigen variasjon. Hos *E. coli* er det for eksempel påvist omlag 100 forskjellige K-

antigener. Et mer regelmessig, ekstra proteinlag (A-lag) finner en hos *Aeromonas salmonicida* (TRUST et al. 1980). Disse lagene gir cella økt beskyttelse mot omverdenen. A-laget synes å være medansvarlig for den sammenklumping som er karakteristisk for virulente *A. salmonicida*-stammer og er også involvert når cella fester seg til spesielle vevstyper (UDEY & FRYER 1978; KAY et al. 1981; EVENBERG et al. 1982). Dette proteinlaget mangler (i stor utstrekning) hos ikke-virulente mutanter av organismen (EVENBERG et al. 1982). WARD et al. (1985) stiller imidlertid spørsmål om sammenhengen mellom A-lag og virulens (ikke om sammenhengen mellom sammenklumping og virulens) på bakgrunn av identifisering av en virulent stamme uten A-lag, men med evnen til sammenklumping. CHART et al. (1984) har vist at O-antigener kan stikke ut gjennom slike ekstra protein A-lag hos virulente *A. salmonicida*-stammer. WARD et al. (1985) fant imidlertid samsvarende varmelabile antigener hos de undersøkte A⁺ og A⁻ cellene, noe som kan tyde på at O-antigener ikke var involvert ved sammenklumping av cellene. Varmelabile antigener ble ikke undersøkt (ibid.).

I tillegg til de nevnte yttermembran-molekyler, forekommer proteinstrukturer som flageller (H-antigener) og fimbrier (F-antigener; ØRSKOV & ØRSKOV 1984). Flagellene er ansvarlig for celle-bevegelse, men har muligens også betydning som festeredskap (CHITINIS et al. 1982; MERREL et al. 1983). SJØBLAD et al. (1985) har vist at flageller også kan forårsake sammenklumping av bakterier. CHART (1983) fant en sammenheng mellom antall flageller hos *V. anguillarum* og virulens hos ål (multiflagellerte varianter mest virulente), men kunne ikke forklare flagellenes rolle i sjukdomsutviklingen. De mindre og noe stivere fimbriene har hovedsakelig festefunksjoner (KORHONEN et al. 1984).

De mest sentrale overflatestrukturer hos *Vibrio*-bakterier er flageller og lipopolysakkarider (LPS), men også yttermembran-proteiner (omp) bidrar til den antigene "makeup" hos fiskepatogene *Vibrio*-arter (CHART & TRUST 1984; MANNING & HAYNES 1984). Felles (immunogene) yttermembranproteiner er påvist hos flere marine *Vibrio*-arter (ibid.), og disse kan dermed bidra til serologiske kryssreaksjoner.

Hylsen som omgir polare *Vibrio*-flageller består av proteiner som en også finner i bakteriens yttermembran (BAUMANN et al. 1984). De proteiner som forekommer i flagell-kjernen, er forskjellige fra hylse-proteinene og danner dermed grunnlaget for minst to H-antigen-typer. Det er påvist kryssreagerende H-antigener fra forskjellige *Vibrio*-arter (BHATTACHARYYA 1975; SHINODA et al. 1976; STEIN et al. 1984). SHINODA et al. (1980) har vist at spesifikke hylse-antigener forekommer, og at antigener felles for flere *Vibrio*-arter finnes i flagell-kjernen. Spesifikke H-antigener er bekreftet av flere (TASSIN et al. 1983; DONOVAN 1984).

H-antigener er, i motsetning til O-antigener, varmelabile.

Den andre hovedstrukturen, LPS, danner grunnlaget for inndeling i O-serotyper. Blant *Vibrio*-bakterier, har den mest inngående inndelingen vært foretatt med *V. cholerae*. Et vanlig skille går mellom 01-type og non-01-type *V. cholerae*. Den siste gruppen er under utarbeidelse og deles inn i et økende antall O-serogrupper (DONOVAN

1984). Kjennskapet til O-antigener fra fiskepatogene *Vibrio* er begrenset. *V. anguillarum* er som eksempel foreløpig inndelt i ganske få O-serogrupper (JOHNSEN 1977; EZURA 1980; KITAO et al. 1983, 1984). Det er derfor lagt lite vekt på å plassere TEO-bakteriene til kjente O-serogrupper.

3.2 MATERIALER OG METODER.

3.2.1 Buffer løsninger.

Mettet ammoniumsulfat løsning (SAS).

800 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ løses i kokende dest H_2O og avkjøles til romtemperatur. pH justeres til 7.2 med ammoniakk (svovelsyre). Lagring ved 4°C .

AUN-buffer (for eluering ved affinitetskromatografi).

Bufferen består av Na-acetat (0.2 M), deionisert urea (4.0 M) og NaCl (1.5 M). pH ble justert til 4.1 med konsentrert eddiksyre.

Barbital-buffer, pH 8.2 (0.08 M). (til immundiffusjonstest/"Ouchterlony")

1. 12.00 g 5'5-dietylbarbitursyre-natrium salt i 800 ml dest H_2O
2. 4.40 g barbitur syre i 150 ml dest H_2O ved 95°C .

Løsning 1 og 2 blandes og pH justeres til 8.2 med kons NaOH. 0.02% NaN_3 tilsettes før lagring ved 4°C .

Fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS), pH 7.2, 0.15 M.

8.00 g NaCl
0.20 g KCl
1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.008 M)
0.20 g KH_2PO_4
pr 1000 ml dest H_2O .

PBSA - PBS tilsatt 0.2% (w/v) bovint serum albumin (Sigma).

PBSS - PBS tilsatt 5% (w/w) inaktivert ($56^\circ\text{C}/30$ min.) normalt saueserum.

Fosfatbuffer, pH 7.4, 0.08 M fosfat tilsatt 0.5 M NaCl.

2.14 g KH_2PO_4
11.46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
29.22 g NaCl

pr 1000 ml H_2O tilsatt 0.02% NaN_3 .

Glycin-HCl buffer, pH 2.5, 0.1 M
(for sur eluering av antistoffer ved affinitetskromatografi)

500 ml 0.2 M glycinløsning (15.01 g/1000 ml) titreres til pH 2.5 med 0.2 M HCl; totalvolumet justeres til 1000 ml.

Tris-HCl buffer, 15 mM, pH 8.0

1.81 g Tris base (Sigma) løses i 500 ml dest H₂O pH justeres med 1 M HCl til pH 8.0 før totalvolumet justeres til 1000 ml.

3.2.2 Spesielle metoder:

Ammoniumsulfat felling.

Økende saltkonsentrasjon i en proteinløsning gir økende mengde hydrofobe interaksjoner mellom protein molekyler som derved vil aggregere og felle ut (presipitere). Høy løselighet (lite temperatur-avhengig) gjør ammoniumsulfat velegnet ved felling (oppkonsentrering) av antistoffer (immunglobuliner=Ig). Ammoniumsulfat presipitasjon inngår gjerne som første trinn ved rensing av Ig: Like volumer av proteinløsning og mettet ammoniumsulfatløsning (SAS) ble blandet ved langsom tilsetning av ammoniumsulfat under omrøring (magnetrorer); røringen fortsatte en time ved 4°C. Presipitatet ble spunnet ned (5000 rpm i Sorvall SS-34, 45 minutter ved 4°C), vasket 1 gang i en 50% ammoniumsulfat løsning før resuspensjon og dialyse mot fosfatbuffer (PBS). Eventuelt utfelt materiale ble fjernet ved sentrifugering.

Dobbel immundiffusjonstest (Ouchterlony).

Barbitalbuffer (kap. 3.2.1) tilsatt 2% agar ble smeltet og helt ut på objektglass (eventuelt større glassplater). Etter at agaren var stivnet, ble brønner laget ved hjelp av "brønn-stanser" tilkopleet vannsug. De respektive reagensene ble plassert i brønnene og inkubert natten over i et fukte-kammer (romtemperatur). Gelen(e) ble fotografert direkte, eventuelt etter farging med Coomassie Brilliant Blue R-250 (Difco).

Preparering av anionbytter (DE-52).

En ferdigsvellet DEAE-cellulose anionbytter, DE-52 (Whatman), ble behandlet i følge fabrikantens forskrifter: Ionebyttermaterialet (25 g våtvekt) ble etter rysting over natten i Tris-HCl buffer (15 mM, pH 8.0), filtrert på Buchner trakt og vasket til pH i vaskevannet var 8.0. Før bruk ble ionebyttermaterialet pakket i en kolonne (1.6 x 10.0 cm) og vasket med 1 liter buffer.

3.2.3 Forsøksdyr - behandling og lagring av antisera.

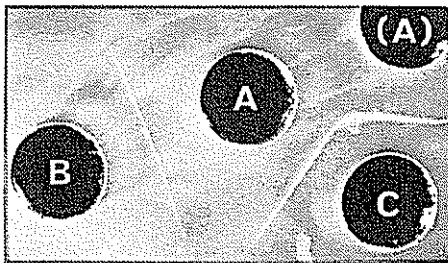
Kaniner ble levert fra Statens institutt for folkehelse (SIF). Kanin antisera mot *V. anguillarum* NCMB 2129 (R- α -NCMB2129), *V. anguillarum* A 3.1 (R- α -A3.1) og *Vibrio* sp. TEO (R- α -TEO) ble framskaffet ved gjentatte injeksjoner av levende

bakterier (subcutant/intramuskulært). Første injeksjon ble gitt i komplett Freund's adjuvans (CFA; Behringwerke AG, Marburg-Vest Tyskland): Bakterier løst i fosfatbufret saltvann (PBS) ble blandet 1:1 med CFA under kraftig omrøring. Hensikten med en slik vann-olje emulsjon er at antigener som befinner seg i vannfasen, skal lekke ut langsomt for derved å forlenge/forsterke antistoff-responsen. Komplette adjuvans inneholder i tillegg drepte mycobakterier som bidrar til økt immunrespons gjennom uspesifikk aktivering av immunforsvaret.

Den andre injeksjonen ble gitt i Freund's inkomplette adjuvans (FIA; inneholder ikke bakterier), deretter 3-5 injeksjoner i fysiologisk saltvann. Hver 14. dag ble ca. 20 ml blod tappet via en ørevene. Ved alle tappinger ble dyret bedøvet med Hypnorm vet. (0.5-0.6 ml/dyr; AB LEO, Helsingborg).

3.2.4 Isolering av kanin IgG.

Prinsippet for denne teknikken er at IgG, som er et basisk protein, ikke fester seg til DEAE-cellulose ved en gitt pH og ved bestemte elueringsbetingelser (FAHEY & TERRY 1973; HUDSON & HAY 1980): Immunglobuliner fra normalt kaninserum (NRS) ble felt i en ammoniumsulfat løsning (50% metning) før dialysering i 3 døgn mot ionebufferen (15 mM Tris-HCl, pH 8.0). Proteinløsningen ble applisert på en DE-52 kolonne (kap. 3.2.2). "Void" fraksjonene ble slått sammen, konsentrert ved ultrafiltrering (Amicon, YM-10 filter) og dialysert mot fosfatbufret saltvann (PBS). IgG-fraksjonen ble testet ved dobbel immundiffusjon mot sau anti-kanin IgG antiserum og geit anti-kanin IgG antiserum før kopling til CNBr-aktivert Sepharose-4B (Pharmacia, Sverige).



FIGUR 3.2: Dobbelt immundiffusjonstest av kanin IgG (A) mot sau anti-kanin IgG antiserum (B) og geit anti-kanin IgG antiserum (C). Figuren viser at de rensede immunoglobulinene er av typen Ig G.

3.2.5 Kopling av protein til CNBr-aktivert Sepharose-4B.

Renset IgG fra kanin (10 mg) ble koplet kovalent til CNBr-aktivert Sepharose på følgende måte (WESTON & SCORER 1978; Anon. 1979):

1. Sepharose 4B (3.0 g) ble etter svelling (15 min) vasket med 1 liter 1 mM HCl (VOLUCON; May & Baker, England).
2. Sepharosen ble vasket raskt med koplingsbuffer (15 ml; NaHCO_3 , 0.1 M, pH 8.3 tilsatt 0.5 M NaCl) og umiddelbart blandet med proteinløsningen (10 mg IgG løst i 25 ml koplingsbuffer). Blandingen ble rystet (rystemaskin) natten over ved 4°C.
3. Koplingsbufferen i blandingen ble suget av før vask med ytterligere 75 ml

koplingsbuffer. Mengden protein i denne supernatanten ble beregnet spektrofotometrisk ($OD_{280}=1.4$ tilsvarer 1.0 mg/ml), og dannet grunnlaget for beregning av mengde (%) IgG koplet til Sepharosen.

4. Resterende aktive grupper ble blokkert med 1 M monoetanolamin (16 timer lett rysting ved 4°C) i koplingsbuffer.
5. Kolonnematerialet ble vasket vekselvis med 100 ml fosfatbuffer (pH 7.4), glycin-HCl (0.2 M, pH 2.5), fosfat-buffer, AUN (pH 4.1) og deretter fosfatbuffer natten over.

Koplingsprosent: 94%

3.2.6 Affinitetsrensing av sau anti-kaninlg antistoffer (ab_2).

Antistoffer produsert i sau mot kanin IgG, inneholder i utgangspunktet en rekke uspesifikke antistoffer. De antistoffene som er bærer av den radioaktive isotopen i en RIA (ab_2), bør utelukkende rette seg mot ab_1 . Derved oppnår en høye telletall og unngår store bakgrunnsverdier (cpm). De ønskete (spesifikke) antistoffene ble isolert ved hjelp av affinitetskromatografi:

1. Ammoniumsulfatpresipiterte (50% metning) immunglobuliner fra sau anti-kaninIgG antiserum løst i fosfatbufret saltvann (PBS) ble applisert på Sepharose-4B-kaninIgG- kolonna (flow: 10 ml time⁻¹). Ettervask ble foretatt over natten med PBS.
2. Spesifikke antistoffer ble eluert med 0.2 M Glycin-HCl, pH 2.5. Fraksjonene i proteintoppen ble slått sammen og dialysert mot PBS.

3.2.7 Iodering av proteiner (FRAKER & SPECK 1978).

Iodering av affinitetsrensete sau anti-kaninIgG antistoffer ble foretatt i 5 ml reagensrør "coatet" med 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglucoluril (Iodo-gen, Pierce chemicals). Iodo-gen virker som oksydasjonsmiddel ved ioderingsreaksjonen.

"Coating": 10 mg iodogen ble løst i 100 ml kloroform. Til hvert rør ble pipetert 120 ul iodogen/kloroform; kloroform ble dampet bort med N₂.

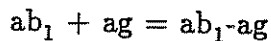
Iodering: Røret ble vasket en gang i fosfatbuffer (0.2 M; pH 7.4) for å fjerne eventuelle løse skall av iodogen. Proteinene var løst i fosfatbufret saltvann (PBS).

Reagenser: 1. 10 ul ¹²⁵I (1 mCi) 2. 25 ul fosfatbuffer (0.2 M, pH 7.4) 3. 100 ul protein (konsentrasjon ca 1 mg/ml)

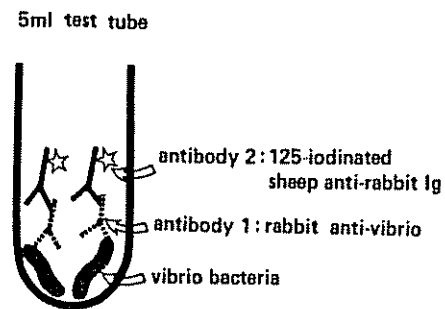
1,2 og 3 ble blandet og inkubert 10 minutter på is etterfulgt av dialysering over natten mot 5 liter PBS tilsatt 1 g/liter KI. Etter dialysen ble (>10 mg/ml) bovint serum albumin (BSA; Sigma) tilsatt for å stabilisere de ioderte antistoffene.

3.2.8 Serologisk klassifisering av bakterier.

Figur 3.3 viser prinsippet for den radioimmunoassay (RIA) som ble benyttet til serologisk klassifisering av bakterier. Ved å blande kanin antiserum (ab_1) med en gitt mengde bakterier (ag), vil spesifikke kanin antistoffer reagere med aktuelle overflatedeterminanter:



Overskudd av ab_1 vaskes bort etter at likevekt er etablert (etter HOLM et al. 1985).



Figur 3.3

Radioaktive merkelapper (ab_2 =affinitetsrensete antistoffer) spesifikke for ab_1 tilsettes i overskudd. Etter at ny likevekt er etablert, vaskes overskudd av ab_2 bort. Mengden av spesifikt bundete kanin-antistoffer (ab_2) vil dermed kunne registreres via de radioaktive merkelappene. Antall cpm blir et uttrykk for **graden av binding** mellom determinanter på bakterieoverflaten og antistoffer fra kaninen (ab_1). Følgende prosedyre ble benyttet:

1. Bakterier i eksponesiell vekstfase (jfr 3.2.9) ble spunnet ned (7000 rpm, Sorvall SS-34, 10 min) og resuspendert i fosfatbufret saltvann tilsatt inaktivert normalt sauserum (PBSS) til $OD_{600}=0.20$.
2. 100 μ l bakteriesuspensjon i 5 ml polystyrenrør ble tilsatt 100 μ l antiserumfortynning (ab_1 fortynnet i PBSS) før inkubering 1 time ved 12°C (jfr. 3.2.9).
3. Overskudd av antistoff ble vasket ut: 4.5 ml PBSA ble tilsatt før sentrifugering (2000 rpm, Sorvall HG-4L, 30 minutter).
4. 200 μ l ^{125}I -sau-anti-kanin antistoff (50 ng; jfr. 3.2.9) ble tilsatt før ny inkubering, vask og tørking av rørene (opp/ned på celledoff).
5. Bundet radioaktivitet (cpm) ble målt i en LKB 1272 Clinigamma gammateller.

Det ble benyttet 3 paralleller. ab_2 (og ab_1) var inaktivert ($56^\circ\text{C}/30$ min) før bruk.

3.2.9 Parametre av mulig betydning for serologi-assayen.

Dette underkapittel omhandler betydningen av variasjoner i prosedyren for serologisk klassifisering. Variablene er: **inkuberingstemperatur, bakteriekulturens alder samt titrering av ab_2** . Inkuberingstiden (3.2.8 pkt 2) på 60 minutter ble valgt av praktiske grunner (kjøring av flere serier i rekkefølge). Inkuberingstider på 75 og 90 minutter gav uendrete resultater (resultatene er ikke tatt med). De øvrige testene ble gjennomført med to fortynninger av ab_1 : 1/500 og 1/1500.

Ved forsøkene ble det benyttet TEO 83.001 kulturer dyrket ved 12°C på et

standardmedium (HS-TEO medium tilsatt 10% FP-7.5; se kap. 2.2.1). Kulturene ble høstet i eksponensiell vekstfase, tetthet (OD_{600}) oppgis i hvert tilfelle.

Variierende inkuberingstemperatur.

Følgende temperaturer ble benyttet for å undersøke hvorvidt inkuberingstemperaturen hadde innflytelse på serologi-resultatene: 4, 12, 16 og 25°C. TEO 83.001 bakterier ble høstet ved $OD_{600}=0.40$. Vaskebufferne var pretempererte til de respektive temperaturer. Bakgrunn ble registrert ved hver temperatur (ab_1 =normalt kaninserum fortynnet 1/100).

TABELL 3.1 Betydningen av inkuberingstemperaturen ved serologisk karakterisering.

Inkuberings- temperatur	Antistoff (ab_1V)					
	Kanin- α -A3.1		Kanin- α -NCMB 2129		Kanin- α -TEO	
	1/500*	1/1500	1/500	1/1500	1/500	1/1500
4°C	5.1**	3.1	3.3	2.1	10.0	10.0
12°C	6.8	3.6	3.4	1.9	8.2	9.3
16°C	5.2	4.5	3.4	2.4	10.1	10.8
25°C	9.9	5.9	5.2	2.8	14.6	8.4

* Tallene representerer fortynninger av ab_1 .

** Tallene oppgitt i % av total cpm (198.800).

Bakgrunn (1.0%) er trukket fra.

Mengde ab_2 tilsatt: 50 ng

Konklusjon: Tallene viser ubetydelige variasjoner mellom de forskjellige temperaturene. Ut fra laboratoriepraktiske hensyn, samt ønsket om å operere innenfor bakteriens funksjonelle temperaturområde, er 16°C valgt som inkuberingstemperatur ved de påfølgende serologi-tester.

Kulturens alder.

Både kvantitative (BUCKLEY et al. 1981) og kvalitative (CROSA & HODGES 1981) endringer i bakteriers overflateegenskaper kan forekomme ved varierende kulturbetingelser. For å undersøke om kulturens alder virker inn på resultatene, ble TEO 83.001-kulturer høstet i forskjellige faser av vekst og testet slik tidligere beskrevet (3.2.8). Bakteriene ble dyrket ved 12°C og høstet etter 18, 24, 31, 42 og 70 timers vekst ($OD_{600}=0.40-1.15$; pH 7.45-8.0). Det ble benyttet 5% inokulum fra kulturer med OD_{600} lik 0.4.

TABELL 3.2 Betydningen av kulturens alder ved serologisk karakterisering.

Kulturens alder	Antistoff (ab_1V)					
	Kanin- α -A3.1		Kanin- α -NCMB 2129		Kanin- α -TEO	
	1/500*	1/1500	1/500	1/1500	1/500	1/1500
18 timer	3.0**	1.6	1.7	0.7	14.0	9.6
24 timer	3.4	1.8	2.4	1.0	14.6	11.9
31 timer	3.3	1.3	2.4	1.1	18.9	12.5
42 timer	4.6	2.3	2.7	1.2	17.6	13.3
70 timer	4.5	2.6	2.5	1.3	15.6	12.9

* Tallene representerer fortyndinger av ab_1 .

** Tallene er oppgitt i % av total cpm (163.000) etter at bakgrunnen (0.6%) er trukket fra (31 timers kultur).

Inkuberingstemperatur: 16 °C.

Mengde ab_2 tilsatt: 50 ng

Konklusjon: Kulturens alder synes ikke å påvirke resultatene. Kulturer dyrket 24-48 timer (eksponesiell vekst) er benyttet både ved injeksjoner i kanin (produksjon av antiserum) og ved testing av serologisk variasjon. Kulturer yngre enn 18 timer var av praktiske grunner (langsom vekst) lite aktuelle og inngår derfor ikke i tabellen.

Titrering av antistoff 2 (ab_2).

Det radioaktivt merkete sau anti-kanin IgG antistoffet ble fortynnet 2-fold. Utgangsløsningen var fortynnet slik at 200 ul inneholdt 50 ng protein. Bakgrunn ved hver fortynning ble registrert ved tilsats av normalt kaninserum fortynnet 1/100 (ab_1). Kulturen (TEO 83.001) ble dyrket til $OD_{600} = 0.48$.

TABELL 3.3 Titrering av radioaktivt antistoff (ab_2)

Mengde ab_2 (ng)	Total cpm	Bak- grunn*	ab_1 -fortynning	
			1/500	1/1500
50	213.450	1.2	10.8**	10.2
25	108.500	1.2	8.7	8.5
12.5	54.700	1.2	11.0	8.8
6.3	26.900	1.3	13.1	10.3
3.2	14.550	1.3	11.5	9.7
1.6	7.350	1.6	10.6	12.0
0.8	3.830	1.8	11.4	10.8
0.4	2.030	2.8	10.9	12.5
0.2	1.090	4.7	12.8	12.0
0.1	566	6.3	14.6	12.4

* Tallene er oppgitt i % av total cpm tilsatt.

** Tallene er oppgitt i % av total cpm etter at bakgrunnen er trukket fra.

Inkuberingstemperatur: 16 °C.

Antistoff 1 (ab_1): Kanin- α -TEO 83.001

Konklusjon: 50 ng ab_2 ble benyttet ut fra ønsket om rimelige høye telletall (større usikkerhet ved lave verdier, jfr. bindingsprosenten under 2; tabell 3.1 og 3.2). Derved kan samme reagens benyttes over lengre tid (^{125}I ; halveringstid 60 døgn).

Variasjoner mellom parallelle målinger.

TEO 83.001 og 1/1600-fortynninger av kaninantiserer ble benyttet for å undersøke variasjoner mellom de enkelte parallelle. Tjuefem parallelle ble inkubert ved 12°C. Total cpm tilsatt hvert rør: 160.400 (50 ng/200 ul ab_2 -fortynning). Bakgrunn ved tilsats av normalt kaninserum (ab_1) fortynnet 1/100 ble målt til 1.4% av total cpm (bakgrunn er trukket fra i tallene nedenfor).

Antiserum:	Gjennomsnitt: (cpm)	Standard avvik:	Variasjons- koeffisient:
Kanin-anti-A3.1	9.560	945	9.9%
Kanin-anti-NCMB 2129	5.460	1.060	19.5%
Kanin-anti-TEO83.001	14.850	2.030	13.6%

Konklusjon: Tre parallelle benyttes ved alle målinger. Enkeltresultater som avviker med mer enn 10% av gjennomsnittet for parallelle, forkastes.

3.3 RESULTATER:

Resultatene av den serologiske klassifiseringen viste en klar **innbyrdes likhet** mellom *Vibrio* sp. TEO-bakterier. Figur 3.4 viser i hvilken grad antistoffer produsert i kanin mot tre forskjellige *Vibrio*-bakterier bindes til *Vibrio* sp. TEO bakteriene og referansebakteriene.

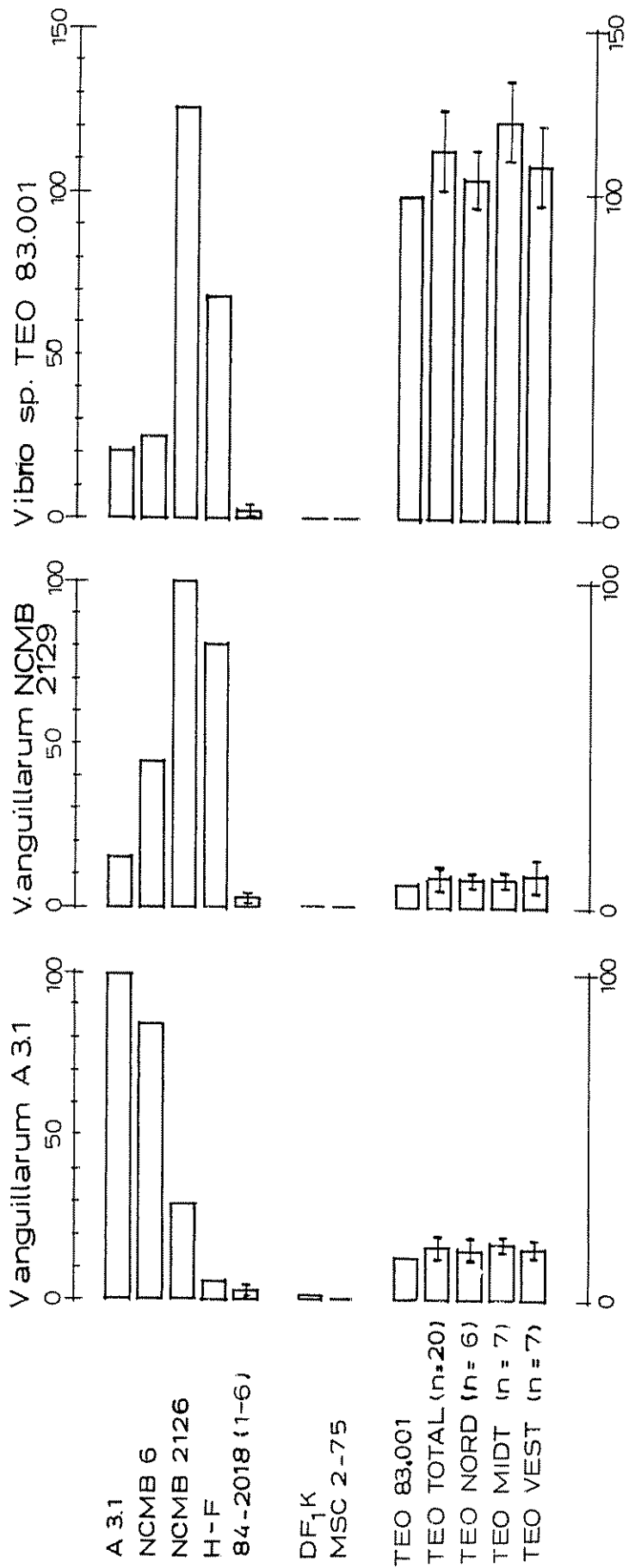
Resultatene viser et tilnærmet identisk serologisk mønster for TEO-bakterier fra de forskjellige delene av kyst-Norge. Dette indikerer at forskjellige isolater av TEO-bakterien uttrykker identiske molekyler (antigener) på overflaten og følgelig at bakteriene er nært beslektet med hverandre. Bindingsprosentene mellom den enkelte bakterie og de benyttete antisera (ab_1 mot A3.1 : NCMB2129 : TEO83.001) viste en liten dag-til-dag variasjon. Det innbyrdes forhold holdt seg imidlertid relativt konstant (for TEO-bakteriene 5:3:25; se tabell A3 i Appendix).

Figuren viser videre at antiserum mot TEO 83.001 gir en sterk (heteroklitisk) kryssreaksjon med NCMB 2129. Antiserum mot NCMB 2129 gir derimot bare svak kryssreaksjon med TEO-bakteriene. Dette indikerer at NCMB 2129 er serologisk forskjellig fra TEO-bakteriene. NCMB 2129 og H-F er isolert fra laksefisk og kryssreagerer med antiserum mot både NCMB 2129 og TEO 83.001, noe som tyder på serologisk slektskap. Reaksjon med anti-A3.1-serum, viser imidlertid en forskjell som kan bety ulik serotype-tilhørighet. *V. anguillarum* A 3.1 og NCMB 6, som begge er isolert fra torskefisk, viser tilnærmet samme serologiske mønster. Forskjellig reaksjon med anti-NCMB 2129-antiserum kan imidlertid tyde på forskjellig sero-type tilhørighet.

Av figuren framgår også kryssreaksjon mellom NCMB 2129 og NCMB 6.

Vibrio anguillarum 84.2018 (1-6) og de to *V. ordalii*-bakteriene som inngår, skiller seg serologisk helt klart fra de øvrige bakteriene.

KANIN ANTI-SERA MOT :



FIGUR 3.4 Serologisk likhet mellom *Vibrio*-arter.

Figuren viser graden av binding av kaninantistoffer produsert mot tre ulike *Vibrio* sp., til overflaten av TEO-bakterier og til referansebakteriene *V. ordalii* (DF₁K og MSC2-75) og *V. anguillarum* (A 3.1, NCMB 6, NCMB 2129, H-F og 84-2018). Bindingsgraden for korresponderende antiserum-bakterie er satt lik 100%. (Standardavvik er markert der resultatene omfatter flere bakterier).

3.4 DISKUSJON:

Resultatene av den serologiske klassifiseringen viste en klar **innbyrdes likhet** mellom *Vibrio* sp. TEO-bakteriene, uavhengig av isoleringssted (figur 3.4).

Den sterke kryssreaksjonen som kom til syne mellom NCMB 2129 og TEO-bakteriene ved bruk av anti-TEO-serum, kan forklares både kvalitativt og kvantitativt. Høyere affinitet mellom antistoffer og determinantene på overflaten av NCMB 2129 sammenliknet med TEO-bakteriene er en mulig forklaring. En like sannsynlig forklaring er at NCMB 2129 har et større antall aktuelle determinanter på overflaten sammenliknet med TEO-bakteriene. Ut fra de foreliggende data er det ikke mulig å gi noen eksakt forklaring på fenomenet. At TEO-bakteriene er serologisk forskjellige fra NCMB 2129, kom tydelig til uttrykk ved bruk av antiserum mot NCMB 2129 (figur 3.4). NCMB 2129-antiserum ga tydelig reaksjon med NCMB 6. Dette til tross for at de involverte bakterier er isolert fra forskjellige fiskeslag. Resultatet er ikke i overenstemmelse med et tidligere arbeid av JOHNSEN (1977) som ved indirekte hemagglutinasjon (PHA; lipopolysakkarider koplet på røde saueblodlegemer) og bakterieagglutinasjon (SA="slide agglutination") ikke kunne påvise noen slik kryssreaksjon. Forskjellig følsomhet i de benyttete serologiske teknikker (RIA= solid-fase radioimmuno-assay mot PHA og SA) er en mulig forklaring på denne uoverenstemmelsen. Det er imidlertid viktig å være klar over at antiseraene er produsert av genetisk forskjellige dyr (kaniner). Dette betyr at hvert av dyrene ikke nødvendigvis "ser" de samme antigenene determinanter på bakterieoverflaten selv om samme bakterie ble injisert. En tredje mulighet er at bakteriene som dannet grunnlaget for de respektive antiseraene, neppe er dyrket ved like betingelser. Dette kan som tidligere nevnt influere på bakterienes overflate-egenskaper og dermed på kaninens "inntrykk" av bakterien. Disse mulighetene for forskjellige antistoff-spesifisiteter i de benyttete antiseraene, synes å være den mest sannsynlige forklaring på uoverenstemmelsen. EZURA et al. (1980) har delt *V. anguillarum*-liknende bakterier inn i tre serotyper, J-0-1, J-0-2 og J-0-3. Begge *V. ordalii*-bakteriene som inngår som referansebakterier samt *V. anguillarum* NCMB 6 er alle plassert i gruppe J-0-1. Egne resultater viste som nevnt en svak kryssreaksjon mellom NCMB 6 og NCMB 2129. Dersom en sammenholder arbeidene til EZURA (ibid.) og JOHNSEN (1977), tilhører NCMB 2129 serogruppe J-0-3. Sammen med egne resultater tilsier det kryssreaksjon mellom EZURAs-gruppene J-0-1 og J-0-3, hvilket kan forklares ut fra felles H- eller omp-antigener (egne bakterier ikke varmebehandlet).

Serologiske inndelinger av *Vibrio*-bakterier er som nevnt under stadig utarbeidelse (DONOVAN 1984). Det er derfor ikke lagt særlig vekt på plassering av TEO-bakteriene til kjente grupperinger.

Det er imidlertid klart at TEO-bakteriene representerer en relativt **homogen** serologisk bakteriegruppe. Dette synes å være en bekreftelse på resultatene fra kapittel 2 som basert på biotyping viste at TEO-bakteriene utgjør en homogen gruppe med karakteristika forskjellige fra kjente *Vibrio*-bakterier.

KAPITTEL 4.

"FINGERAVTRYKK" AV DNA FRA UTVALGTE VIBRIO SP. TEO-BAKTERIER.

4.1 Innledning.

De foregående kapitler har avdekket en del fenotypiske egenskaper ved *Vibrio sp.* TEO-bakterier. Det er påvist svært mange likhetstrekk mellom de forskjellige bakteriene både biokjemisk (kap. 2) og strukturelt/immunologisk (kap. 3).

I dette kapitlet undersøkes egenskaper ved TEO-bakteriers DNA, nærmere bestemt det elektroforetiske mønster som framkommer etter at DNA er behandlet med et restriksjonsenzym.

Restriksjonsenzymet kutter en DNA-helix på steder der spesielle kombinasjoner av DNA-baser forekommer. Antall og plassering av slike spesielle basesekvenser langs DNA-tråden er spesifikt for den enkelte bakteries DNA (genom). Resultatet av en restriksjonsbehandling er grupper av DNA-fragmenter med ulik størrelse og disse kan separeres ved elektroforese. Det mønsteret som dannes ved elektroforesen ("fingeravtrykkene"), blir dermed spesifikt for den enkelte bakterie.

Restriksjonsenzymet som ble benyttet er isolert fra *Haemophilus influenzae* R_d og betegnes *Hin* dIII. Dette enzymet gjenkjenner en symmetrisk basesekvens på 6 baser, **AAGCTT** (5'-enden mot venstre) der kutting skjer mellom de to adenin komponentene (produktinformasjon fra Amersham International plc, England).

Metodene som er beskrevet i dette kapitlet er i hovedsak hentet fra BJORVATN et al. (1984).

4.2 MATERIALER OG METODER:

4.2.1 Buffer løsninger.

Tris-buffer, 50 mM, pH 8.0:

6.05 g Tris base (Sigma) løses i 700 ml destillert H₂O. pH justeres med 2 M HCl til 8.0 før totalvolumet justeres til 1.0 liter.

Tris-sukrose buffer:

Tris-buffer (50 mM, pH 8.0) tilsettes 25% (w/v) sukrose (Koch-Light).

Lysis-mix:

10 mM EDTA (Etylendiamintetraeddiksyre, Sigma) og 2% (v/v) Triton X-100 (BDH chemicals Ltd.) ble løst i Tris-buffer (50 mM, pH 8.0).

DNA-buffer: (10x)

100 mM Tris base (12.11 g/l) og 100 mM NaCl (5.84 g/l), pH ble justert til 7.4 med 2M HCl før totalvolumet ble justert til ønsket volum. Før bruk: fortykning (1:10) med destillert, sterilt H₂O.

Restriksjonsbuffer (10x):

100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂ og 600 mM NaCl; pH justert til 7.5

Gelbuffer, pH 8.3: (10x)

72.36 g Tris-base (Sigma) 36.85 g borsyre (Fluka) 6.23 g Na₂-EDTA (Koch-Light) tilsatt destillert H₂O opp til 1.0 liter.

Fargemarkør:

0.05 % bromfenolblått (Merck, p.a.) løst i 50% glycerol (Sigma).

4.2.2 Isolering av DNA.**Bakterier og dyrkingsbetingelser:**

Tre type TEO-bakterier fra forskjellige geografiske områder (HI-7751, TEO 84.020 og TEO 83.001) ble benyttet sammen med følgende referansebakterier: *Vibrio anguillarum* A3.1, NCMB 6 og NCMB 2129, *V. ordalii* MSC2-75. Bakteriene ble dyrket på HS-TEO medium/10% FP-7.5 (kap. 2.2.1) i rystekulturer (15 ml i 50 ml-Erlendmeyerkolber, 250 rpm) og høstet i eksponensiell vekstfase. Cellene ble samlet ved sentrifugering (8000 rpm, Sorvall SS-34, 10 minutter, 4°C) i sterile Corex-rør og deretter vasket en gang i 1.4 ml Trissukrose bufferen, pH 8.0. Denne suspensjonen ble overført til Eppendorf-rør (benyttet i resten av prosedyren) og cellene sentrifugert ned (2 minutter; Eppendorf sentrifuge: Haemofuge 78, 15.000 rpm). Omlag 100 ul av de bunnfelte cellene ble resuspendert i Tris-sukrose-bufferen (160 ul).

Oppløsning av celleveggene.

Samtlige løsninger som inngår i den påfølgende prosedyre var kalde (0-4°C), og alle inkuberinger ble foretatt på is (0°C). Alt glassutstyr som ble benyttet var tørrsterilisert og alle buffere var autoklavert, eventuelt sterilfiltrert før bruk. Den resuspenderte bakterie-suspensjonen (forrige avsnitt) ble tilsatt følgende løsninger:

1. 100 ul lysozym (5 mg/ml;Sigma) og 10 ul RNase (1 mg/ml; Sigma R5500), begge løst i 50 mM Tris-buffer pH 8.0. Løsningene ble blandet godt før inkubering på is (40 minutter). RNasen var på forhånd kokt i 10 minutter for å inaktivere eventuelle forurensinger av DNase.
2. 50 ul 0.2 M EDTA (pH 8.0) ble tilsatt og inkubert 20 minutter på is.
3. Deretter ble 300 ul "lysismix" (EDTA og Triton X-100 i Tris-buffer) og 75 ul pronase (Calbiochem., Behring; 25 mg/ml løst i 50 mM Tris-buffer, pH 8.0) blandet i løsningen, og det hele inkubert 1 time på is før videre behandling. Pronasen var varmet opp til 37°C (2 timer) før bruk.

Ekstraksjon av total-DNA.

Lysatet ble ekstrahert med 150 μ l DNA-buffer (10 mM Tris-buffer, pH 7.4 tilsatt 10 mM NaCl), 300 μ l kloroform og 300 μ l vannmettet, destillert fenol. Rørene ble rystet godt (hvit, homogen løsning) før sentrifugering (2 minutter, Eppendorf-sentrifuge). Vannfasen ble pipettert av og ytterligere ekstraksjoner ble foretatt ved tilsetning av ett volum vandig fenol (røret ble fylt opp med fenol). Denne prosedyren ble gjentatt til vannfasen var helt klar (inntil 6 ganger). Vannfasen ble så dialysert ved 4°C (med røring) mot 1 liter DNA-buffer over natten. Dialyseslangene (Spectrapor) var på forhånd kokt 10 minutter og deretter skylt godt i DNA-buffere.

DNA konsentrasjonen ble målt spektrofotometrisk ($OD_{260}=1.0$ tilsvarer 50 μ g/ml DNA). Produktets renhet ble undersøkt ved å måle absorpsjonen over området 230-320 nm. Eventuelle proteinforurensinger gir topp ("skulder") ved 280 nm. En topp ved 260 nm, ingen proteintopp og OD_{280}/OD_{260} tilnærmet lik 0.5, indikerer rent produkt.

4.2.3 Restriksjonsbehandling av DNA.

DNA (30 μ g) ble tilsatt 2 enzymenheter Hind III (Amersham International plc, England) per μ g DNA (det benyttete enzym hadde en konsentrasjon på 30.000 enheter/ml, derav 2 μ l tilsatt), 10 μ l konsentrert (restriksjons-) buffer (Tris, Mg^{2+} og NaCl; pH 7.5) før totalvolumet ble justert til 100 μ l med sterilt, destillert H_2O . Det hele ble inkubert 3 timer i vannbad ved 37°C.

4.2.4 Polyacrylamidgel-elektroforese.

Separasjon av DNA fragmentene foregikk i en vertikal "slab"-gel (2 mm tykk; LKB 2001 "Vertical Electrophoresis unit").

Til hver gel ble benyttet:

- 5 ml Acrylamid (40%)/Bis (1.6%; Bio-rad)
- 5 ml gelbuffer, pH 8.3 (10x)
- 15 ml glycerol (87%)
- 25 ml destillert H_2O

Disse løsningene ble blandet og avgasset før støping av gelen. Polymeriseringen startet ved tilsetning av:

- 15 μ l TEMED (Bio-rad) og
- 300 μ l 10% Ammoniumsulfat (Bio-rad).

Før applisering av prøvene, var gelen stabilisert ved "forkjøring" i 30 minutter (20 mA). Geltemperaturen ble holdt på 10°C ved hjelp av kjølekappe tilkopledd vannbad.

Som standard inngikk HindIII-kuttet DNA fra P4-fag (gave fra V. Lund, Institutt for medisinsk biologi, UiTø). Hver standard bestod av 10 μ l (1-2 μ g) P4-DNA, 15 μ l DNA-buffer og 10 μ l fargemarkør. Fragmentstørrelsen av P4-DNA kuttet med HindIII ble beregnet ifølge data fra KAHN & HOPKINS (1978). Prøvene var tilsatt fargemarkør (10 μ l) før applisering i gelbrønnene.

Elektroforesebetingelser: 20 mA per gel (maks 580V) i 19-20 timer. Gelene ble farget

(15 minutter) i destillert vann tilsatt etidiumbromid (0.002%) og skylt i destillert vann (30 minutter) før fotografering (kortbølget UV-lampe, 254 nm, benyttet ved gjennomlysning av gelen).

Filter: Kodak Porter professional filter nr. 2B
Film: Polaroid type 55 P/N (50 ASA/18DIN)

Båndmønstrene ble nærmere undersøkt etter at negativene var analysert ved hjelp av et LKB (Bromma, Sverige) 2202 Ultrascan Laser densitometer.

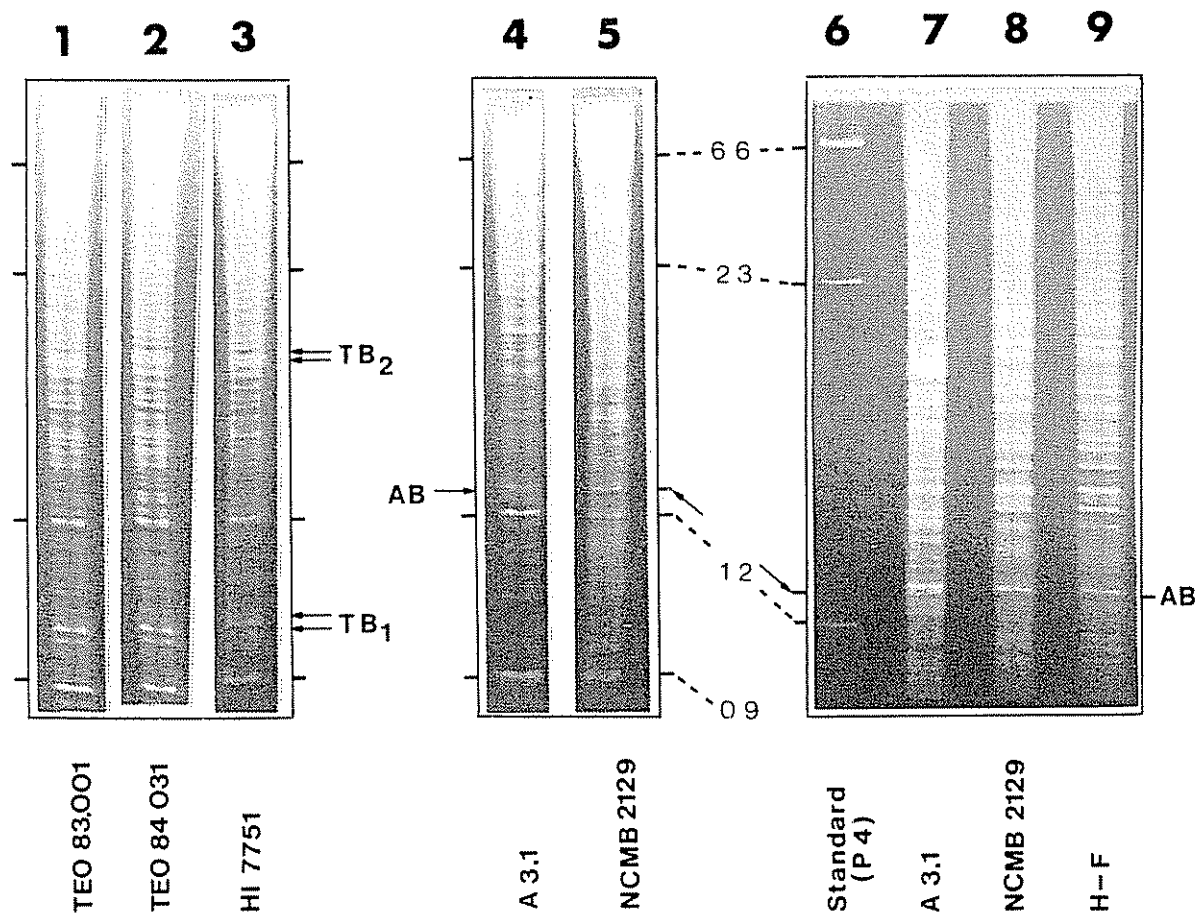
4.3 RESULTATER:

Mengde DNA ekstrahert fra de forskjellige bakteriene varierte mellom 300 og 1000 ug/ml.

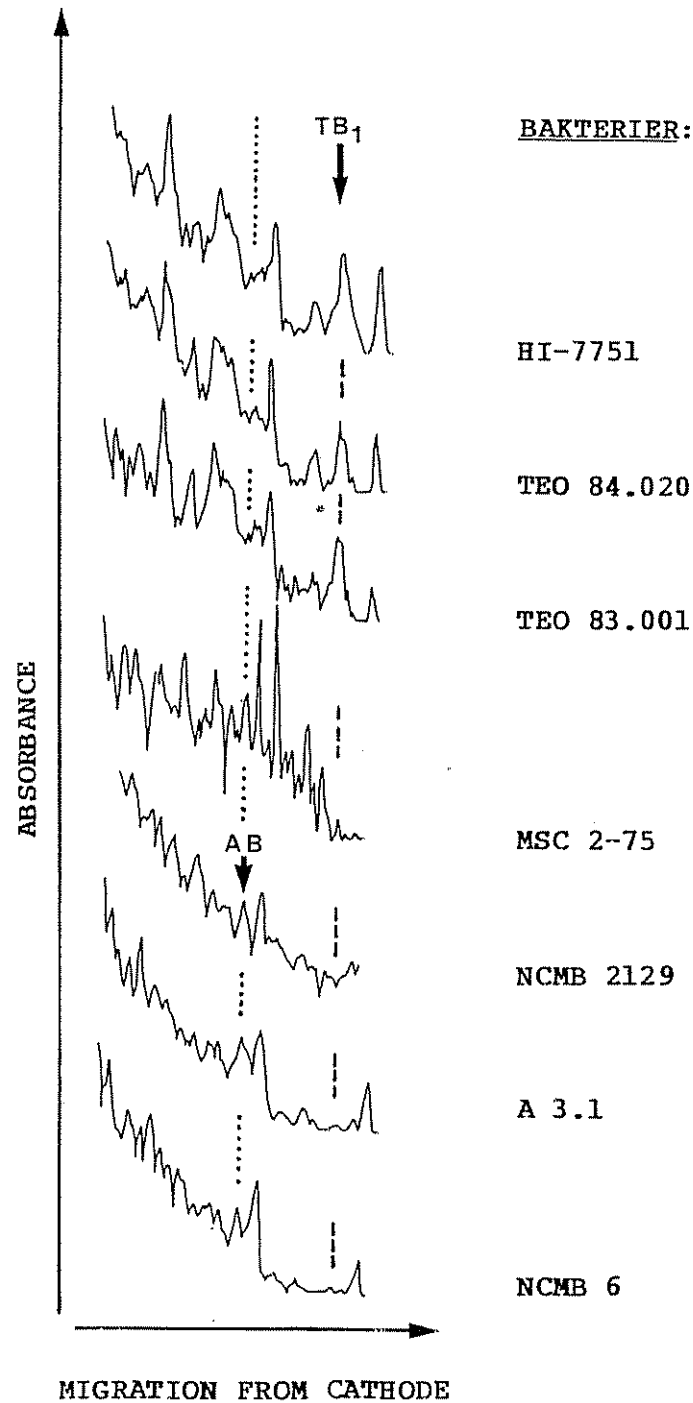
Resultatet etter restriksjonsbehandling med *Hind*III og polyacrylamid-elektroforese, ga mer enn 60 forskjellige bånd med varierende intensitet, og med en akseptabel separasjon av båndene. Figur 4.1 viser restriksjonsmønstrene, eller "fingeravtrykkene" av DNA fra 3 forskjellige TEO-isolater og 3 *V. anguillarum*-bakterier. TEO-isolatene (brønnene 1,2 og 3) har tilsynelatende like båndmønstre, forskjellige fra de øvrige bakteriene. Figuren viser også forskjeller mellom "fingeravtrykkene" fra *V. anguillarum*-bakterier fra laksefisk (brønnene 5,8 og 9) og fra torsk (brønnene 4 og 7).

TEO-"fingeravtrykkene" viste to tydelige bånd omkring 1.0 kilobaser (TB_1) som bare var svakt synlige i brønnene 4,5 og 7-9. Det samme gjaldt to bånd i området 2.0 kilobaser (TB_2). DNA fra *V. anguillarum*-bakteriene ga på sin side ett tydelig bånd omkring 1.4 kilobaser (AB) som bare såvidt kunne skimtes på "fingeravtrykk" av TEO-isolatene. De øvrige båndmønstrene indikerer at forskjellene ikke skyldtes varierende DNA-konsentrasjoner. Ulikhetene avspeiler følgelig reelle forskjeller i antall, og avstand mellom restriksjonssetene på de respektive DNA trådene.

De nevnte forskjellene var særlig tydelige etter at de fotografiske negativene var analysert ved hjelp av laserdensitometeret (figur 4.2).



FIGUR 4.1: DNA-”fingeravtrykk” av tre *Vibrio* sp. TEO isolater: TEO 83.001, TEO 84.031 og HI-7751. Referansebakteriene er: *V. anguillarum* NCMB 2129, H-F og A 3.1, den første fra regnbueørret, den neste fra laks og den siste fra torskefisk. Som størrelsesmarkør er benyttet fag P4 DNA kuttet med *Hind*III (6.6, 2.3, 1.2 og 0.9 kilobaser). Båndene TB₁ og TB₂ synes å være spesifikke for type TEO-bakteriene. AB finnes som et tydelig bånd hos referansebakteriene, men ikke hos type-TEO bakteriene. Figuren viser også forskjellige båndmønstre hos *V. anguillarum*-bakterier isolert fra torsk- og laksefisk. (Menge bakterielt DNA pr. brønn: 27-30 ug).



FIGUR 4.2: Figuren viser "fingeravtrykkene" av DNA fra tre geografisk forskjellige TEO-bakterier etter at de fotografiske negativene av polyacrylamid-gelen er analysert ved hjelp av laser-densitometer. Til sammenlikning er tatt med tre forskjellige *V. anguillarum*-bakterier (A 3.1, NCMB 6 og NCMB 2129) og *V. ordalii* MSC2-75 (modifisert etter HOLM et al. 1985).

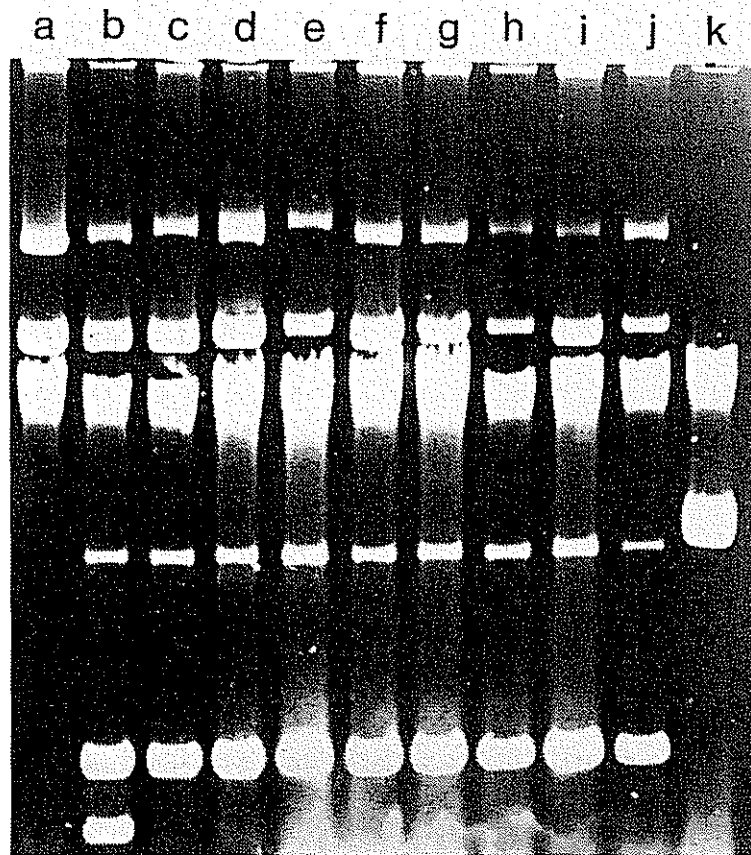
4.4 DISKUSJON.

Som tidligere nevnt, vil DNA-fragment båndene på polyacrylamidgelen ("fingeravtrykkene") avspeile **antall- og plassering** av restriksjons seter langs de undersøkte DNA-trådene. Variasjoner i de forskjellige båndenes intensitet, avhenger av faktorer som DNA repetisjon, forskjellige fragmenter med lik lengde og varierende grad av metylerte restriksjons seter (BJORVATN et al. 1984). Det forutsettes at DNA tråden er kløvyd fullstendig av restriksjonsenzymet, slik at "falske" fragmenter ikke forekommer. Dersom plasmider forekommer, vil de kunne bidra til forskjeller i bånd-intensitet. Dette er et viktig poeng ved tolkningen av resultatene i dette kapitlet. Det er kjent at plasmider forekommer i *V. anguillarum*-bakterier, og at disse kan være store (over 100 kB; TORANZO et al. 1983).

Hvorvidt de aktuelle referansebakteriene inneholder plasmider, er ikke kjent. TEO-bakteriene inneholder plasmider (VALLA pers medd. 1985; se fig. 4.3). Dette kan være forklaringen på visse forskjeller i "fingeravtrykk" mellom TEO-bakteriene og de benyttete referansebakteriene. Det er imidlertid vist (WIJK, pers medd. 1985) at DNA fra HI-7751 og TEO 83.001 begge hadde et innhold av guanin og cytosin (molprosent G+C: 41-42) forskjellig fra både *Vibrio anguillarum* (NCMB 6 og NCMB 2129; ca. 47%), *V. ordalii* (DF₁K og MSC 2-75; 46-48%) og *V. parahemolyticus* (46%). WIJK fant også ved hybridiseringsforsøk liten grad av homologi mellom HI 7751 (type TEO) og bakteriene nevnt ovenfor (30-39% homologi). Dette kan tyde på at de registrerte forskjeller i "fingeravtrykk" ikke skyldes ulikt plasmidinnhold.

Ved å fjerne plasmidene på forhånd vil metoden sansynligvis kunne avsløre forskjeller i kromosomalt DNA fra de aktuelle bakteriene.

Metoden representerer muligens en fremgangsmåte for å kunne påvise forskjeller mellom patogene og ikke-patogene bakterier.



FIGUR 4.3: Figuren viser et plasmidkart for TEO-bakteriene. Bakteriene er 84.031 (a), 84.029 (b), 84.028 (c), 84.026 (d), 84.025 (e), 84.024 (f), 84.023 (g), 84.022 (h), 84.021 (i), 84.020 (j) og 83.001 (k). De tre nordligste isolatene (a, b og k) har et plasmid-mønster forskjellig fra isolatene fra Helgelandskysten (f-j) og Lofoten (c-e). (Analysen er utført av Dr. S. Valla, Universitetet i Trondheim).

Resultatene presentert i dette kapitlet representerer et første forsøk på å anvende en metode tilpasset *Neisseria meningitidis* (BJORVATN et al. 1984) på *Vibrio* sp. bakterier. Slik metoden er anvendt, er det derfor mulig at betingelsene ikke var optimale for *Vibrio* sp. bakterier. Resultatene er imidlertid lovende, og er derfor tatt med i oppgaven.

SAMMENDRAG

Sjukdom på fisken er det største økonomiske problemet for dagens lakseoppdrettere. Den sjukdommen som i de senere årene har påført næringen de største tapene, er såkalt "Hitrasjuke" eller "Hemorrhagisk syndrom" (HS).

HS forekommer i salt- og brakkvannsmiljø, og har siden 1977 spredt seg langs hele kysten fra Finnmark i nord til Rogaland i sør. Tilfeller av sjukdommen er i år også rapportert i Skottland og på Færøyene.

De kliniske symptomene på HS minner om de en finner ved infeksjoner av Gram-negative bakterier i fisk. Blodmangel, blødninger og unormal utskillelse av væske dominerer bildet, både makro- og mikroskopisk. Sjukdomssymptomene, tilknytningen til saltholdig miljø og det tydelige spredningsmønsteret sørover langs Norskekysten, indikerer at en eller flere marine bakterier medvirker til fiskens død.

Hensikten med denne oppgaven var å isolere og klassifisere bakterier som (eventuelt) forekommer i fisk med HS og som kunne settes i sammenheng med sjukdommen.

Isolater ble tatt fra fiske-nyrer hos døende laks med symptomer på HS. I tillegg ble bakterier forsøkt isolert fra fisk uten disse symptomene. Det var ingen oppvekst av bakterier (eller sopp) på skåler med utstryk av blod fra fisk uten symptomer på HS. Bakteriene som vokste opp etter utstryk fra fisk med HS var tilsynelatende renkulturer som ble betegnet TEO-bakterier. Tjue isolater av TEO-bakterier fra forskjellige lokaliteter langs Norskekysten ble karakterisert biokjemisk (kap. 2) og strukturelt/immunologisk (kap. 3). I tillegg ble DNA-"fingeravtrykk" fra utvalgte TEO-bakterier sammenliknet med referansebakterier (kap. 4).

Resultatene viste at samtlige bakterier tilhørte gruppen *Vibrio*. *Vibrio* sp. TEO-bakterien var "kuldeelskende" (psykrofil) med en maksimums-temperatur omkring 18°C. Den vokste best i området 12-16°C. Den optimale NaCl-konsentrasjonen lå omkring 350 mM (2%), med en nedre grense for vekst omkring 100 mM (0.5%). Optimalt pH-område lå omkring 7.0. Ingen av de undersøkte bakteriene kunne hydrolysere gelatin og (løselig) stivelse, redusere nitrat, fermentere sukrose, utnytte citrat, produsere acetoin ved fermentering av glukose eller produsere indol ved (eventuell) omsetning av tryptofan. I tillegg var følgende tester negative: arginin-dihydrolase, lysin- og ornithin-dekarboksylase. Bakteriene var derimot istand til å fermentere cellobiose, gentiobiose, glukonat, glycerol, mannitol, mannose og trehalose. Resultatene viser at *Vibrio* sp. TEO-bakteriene er en type *Vibrio*-bakterie som tidligere ikke er beskrevet.

Resultatene av den serologiske klassifiseringen viste en klar innbyrdes likhet mellom *Vibrio* sp. TEO-bakteriene, uavhengig av isoleringssted. De var også klart forskjellige fra referansebakterier av typen *Vibrio anguillarum* og *V. ordalii*. Disse resultatene synes dermed å bekrefte resultatene av den biokjemiske karakteriseringen.

DNA fra utvalgte *Vibrio* sp. TEO-bakterier gav "fingeravtrykk" forskjellige fra de benyttete referansebakteriene. Disse forskjellene er imidlertid noe usikre. Bakterienes totale DNA er benyttet, og siden 10 av de undersøkte bakteriene inneholdt plasmider, vil dette ganske sikkert influere på "fingeravtrykkene". Tilnærmet like "fingeravtrykk" av DNA fra bakterier med forskjellige plasmidmønstre (TEO 84.020, 84.031 og 83.001) kan likevel tyde på at plasmidene ikke bidrar signifikant til de observerte forskjeller i "fingeravtrykk".

Konklusjon.

Døende Atlanterhavs-laks med såkalt "Hitrasjuke" ("Hemorrhagisk syndrom") inneholder en bakterie som i oppgaven har fått betegnelsen *Vibrio* sp. TEO. Basert på biokjemiske og serologiske undersøkelser, dannet tjue TEO-isolater fra forskjellige oppdrettsanlegg langs Norskekysten en homogen gruppe, med egenskaper forskjellige fra kjente *Vibrio*-bakterier. Likheten mellom isolater fra oppdrettsanlegg spredt langs en 2000 km lang kystlinje indikerer en sammenheng mellom denne bakterien og "Hitrasjuke" ("Hemorrhagisk syndrom"). Smitteforsøk utført i Bergen og Tromsø tyder på at denne bakterien representerer nok et eksempel på en oportunistisk patogen bakterie. Det vil si at bakterien kan finnes i fisken uten å fremkalle sykdom, men når fiskens motstandskraft av en eller annen grunn svekkes, trenger bakterien gjennom normale barrierer og fremkaller sykdom og død. Forets og miljøbetingelsenes virkning på fiskens immunapparat er følgelig faktorer som bør tillegges stor vekt i kampen mot sykdom på fisken.

Siden TEO-bakterien er isolert fra laksefisk, foreslås navnet *Vibrio salmonicida* på denne bakterien.

LITTERATURLISTE

- ACTIS L.A., S.A. POTTER & J.H. CROSA: "Iron-regulated outer (1985) membrane protein OM 2 of *Vibrio anguillarum* is encoded by virulence plasmid pJM1." J. Bacteriol. 161, 736-742.
- AMEND D.F. & L. SMITH: "Pathophysiology of infectious (1974) hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHN virus." J. Fish. Res. Board Can. 31, 1371-1378.
- ANON. "Affinity chromatophy - principles and methods." (1979) (Pharmacia Fine Chemicals, Sverige), 112 s.
- AOKI T., T. KITAO & K. KAWANO: "Changes in drug resistance of (1981) *Vibrio anguillarum* in cultured ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel, in Japan." J. Fish Dis. 4, 223-230.
- AUSTIN B. & D. ALLEN-AUSTIN: "A review: Bacterial pathogens of (1985) fish." J. Appl. Bacteriol. 58, 483-506.
- BAKER R.J., M.D. KNITTEL & J.L. FRYER: "Susceptibility of chinook (1983) salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to infection with *Vibrio anguillarum* following sublethal copper exposure." J. Fish Dis. 6, 267-275.
- BARRITT M.M.: "The intensification of the Voges-Proskauer (1936) reaction by the addition of alpha-naphtol." J. Path. Bact. 42, 441ff. (Sitert hos HARRIGAN&McCANCE (1966)).
- BAUMANN P., S.S. BANG & L. BAUMANN: "Phenotypic characterization (1978) of *Beneckeia anguillara* biotypes I and II." Curr. Microbiol. 1, 85-88.
- BAUMANN P., L. BAUMANN, S.S. BANG & M.J. WOOLKALIS: "Reevaluation (1980) of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia* and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckeia*." Curr. Microbiol. 4, 127-132.

- BAUMANN P. & L. BAUMANN: "The marine Gram-negative eubacteria: (1981) Genera *Photobacterium*, *Beneckeia*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*." i: "The Procaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria." (eds.: Starr, Stolp, Truper, Balows & Schlegel), Vol. II, kap 104, 1302-1331 (Springer-Verlag, Berlin).
- BAUMANN P. & R.H.W. SCHUBERT: "Family II. *Vibrionaceae*." i: (1984) "Bergeys manual of Systematic Bacteriology" (eds.-in-chief: KRIEG N.R. & J.G. HOLT). Vol. I, 516-517 (Williams & Wilkins, Baltimore).
- BAUMANN P., A.L. FURNISS & J.W. LEE: "Genus *Vibrio*." i: (1984) "Bergeys manual of Systematic Bacteriology" (eds.-in-chief: KRIEG N.R. & J.G. HOLT). Vol. I, 518-538 (Williams & Wilkins, Baltimore).
- BENDICH A., P. D'APOLITO. E. GABRIEL & L.J. MACHLIN: "Interaction (1984) of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immuneresponses to mitogens." J. Nutr. 114, 1588-1593.
- BERGMANN A.M.: "The red boil disease of the eel." (1909) Ber. K. Bayr. Biol. Vers. Stn. Munchen 2, 10-54. (Ref. hos LARSEN 1983).
- BERGMANN A.M.: "A contagious eye-disease, Keratomalacia, among cod (1912) at the south coast of Sweden." Zbl. Bact. Hyg. I. Abt. Orig. 62, 200-214. (Ref. hos LARSEN 1983).
- BHATTACHARYYA F.K.: "*Vibrio cholerae* flagellar antigens: A sero- (1975) diagnostic test, functional implications of H-reactivity and taxonomic importance of cross-reactions within the *Vibrio* genus." Med. Microbiol. Immunol. 162, 29-41.
- BJORVATN B., V. LUND, B.E. KRISTIANSEN, L. KORSNES, O. SPANNE & (1984) B. LINDQUIST: "Applications of restriction endonuclease fingerprinting of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis*." J. Clin. Microbiol. 19, 763-765.
- BLAZER V.S. & R.E. WOLKE: "The effects of alpha-tocopherol on the (1984) immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)." Aquacult. 37, 1-9.
- BRANDON D.L.: "Interactions of diet and immunity." (1984) Adv. Exp. Med. Biol. 177, 65-90.
- BROCK T.D., D.W. SMITH & M.T. MADIGAN: "Biology of micro- (1984) organisms.", 4. utg. Prentice/Hall, New Jersey. 850 s.

- BUCKLEY J.T., S.P. HOWARD & T.J. TRUST: "Influence of virulence (1981) plasmid and geographic origin on outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum*." FEMS Microbiol. Lett. **11**, 41-46.
- CANESTRINI G.: "The predominant disease of eel." (1992) Acti. del R. Instituto Veneto di Scienze. Tomo IV Ser. **7**, 809-814 (Ref. hos LARSEN 1983)).
- CARDWELL R.D. & L.S. SMITH: "Hematological manifestations of (1971) vibriosis upon juvenile chinook salmon." Progr. Fish Cult. **33**, 227-235.
- CHART H.: "Multiflagellate variants of *Vibrio anguillarum*." (1983) J. Gen. Microbiol. **129**, 2193-2197.
- CHART H., & T.J. TRUST: "Characterization of the surface antigens (1984) of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*." Can. J. Microbiol. **30**, 703-710.
- CHART H., D.H. SHAW, E.E. ISHIGURO & T.J. TRUST: "Structural and (1984) immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide." J. Bacteriol. **158**, 16-22.
- CHITINIS D.S., K.D. SHARMA & R.S. KAMAT: "Role of somatic antigen (1982) of *Vibrio cholerae* in adhesion to intestinal mucosa." J. Med. Microbiol. **15**, 53-61.
- CLAUSEN E., A. GILDBERG & J. RAA: "Preparation and testing of an (1985) autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria." (Submitted)
- COLWELL R.R.: "Vibriosis in the environment." (1984) (A volume in Environmental Science and Technology; J. Wiley & Sons). 634s.
- COLWELL R.R. & D.J. GRIMES: "*Vibrio* diseases of marine fish (1984) populations." Helgolander Meeresunters. **37**, 265-287.
- CONROY D.A.: "Studies on the haematology of the Atlantic salmon (1972) (*Salmo salar* L.)." Symp. Zool. Soc. Lond. **30**, 101-127.
- CRICHTON P.B. & D.C. OLD: "Biotyping of *Escherichia coli*" (1979) J. Med. Microbiol. **12**, 473-486.
- CROSA J.H., M.H. SCHIEWE & S. FALKOW: "Evidence for a plasmid (1977) contribution to the virulence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*." Infect. Immun. **18**, 509-513.

- CROSA J.H.: "A plasmid associated with virulence in the marine
(1980) fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron
sequestering system."
Nature 284, 566-568.
- CROSA J.H., L.L. HODGES & M.H. SCHIEWE: "Curing of a plasmid is
(1980) correlated with an attenuation of virulence in the
marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*."
Infect. Immun. 27, 897-902.
- CROSA J.H. & L.L. HODGES: "Outer membrane proteins induced under
(1981) conditions of iron limitation in the marine fish
pathogen *Vibrio anguillarum*."
Infect. Immun. 31, 223-227.
- CROSA J.H., M.A. WALTER & S.A. POTTER: "The genetics of plasmid-
(1983) mediated virulence in the marine fish pathogen *Vibrio*
anguillarum" i: "Bacterial and viral diseases of fish.
Molecular studies." (ed.: J.H. CROSA), s. 21-30.
- DAVIS B.R., R. FANNING, J.M. MADDEN, A.G. STEIGERWALT, H.B.
(1981) BRADFORD jr., H.L. SMITH jr. & D.J. BRENNER:
"Characterization of biochemically atypical *Vibrio*
cholerae strains and designation of a new pathogen
species, *Vibrio mimicus*."
J. Clin. Microbiol. 14, 631-639.
- DONOVAN T.: "Serology and serotyping of *Vibrio cholerae*." i:
(1984) "Vibrios in the environment." (ed.: R.R. Colwell).
s. 83-101, J. Wiley & Sons.
- EGIDIUS E. & K. ANDERSEN: "Norwegian reference strains of *Vibrio*
(1977) *anguillarum*."
Aquacult. 10, 215-219.
- EGIDIUS E., K. ANDERSEN, E. CLAUSEN & J. RAA: "Cold-water
(1981) vibriosis or "Hitra disease" in Norwegian salmonid
farming."
J. Fish Dis. 4, 353-354.
- EGIDIUS E., Ø. SOLHEIM & K. ANDERSEN: "Further observations on
(1984) cold-water vibriosis or Hitra disease."
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 50-51.
- EVELYN T.P.T.: "First records of vibriosis in Pacific salmon
(1971) cultured in Canada, and taxonomic status of the
responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*."
J. Fish. Res. Board Can. 28, 517-525.
- EVENBERG D., R. VAN BOXTEL, B. LUGTENBERG, F. SCHURER, J.
(1982) BLOMMAERT & R. BOOTSMA: "Cell surface of the fish
pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*.
I. Relationship between autoagglutination and the
presence of a major cell envelope protein."
Biochim. Biophys. Acta 684, 241-248.

- EZURA Y., K. TAJIAMA, M. YOSHIMIZU & T. KIMURA: "Studies on the (1980) taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis." *Fish Pathol.* **14**, 167-179.
- FAHEY J.L. & E.W. TERRY: "Ion exchange chromatography and gel (1973) filtration." i: "Handbook of experimental immunology" (ed.: D.M. Weir), 2. utgave, kap. 7, 1-16.
- FJØLSTAD M. & A.L. HEYERAAS: "Muscular and myocardial (1985) degeneration (dystrophy) in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) suffering from the "Hitra disease"." *J. Fish Dis.* **8**, 367-372.
- FODA A.: "Changes in hematocrit and hemoglobin in Atlantic salmon (1973) (*Salmo salar* L.) as a result of furunculosis disease." *J. Fish Res. Board Can.* **30**, 467-468.
- FORD J.E., K.D. PERRY & C.A.E. BRIGGS: "Nutrition of lactic acid (1958) bacteria isolated from the rumen." *J. Gen. Microbiol.* **18**, 273-284.
- FRAKER P. & J.C. SPECK: "Protein and cell membrane iodination (1978) with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglucoluril." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-857.
- GRIMES D.J., R.R. COLWELL, J. STEMMLER, H. HADA, D. MANEVAL, F.M. (1984) HETRICK, E.B. MAY, R.T. JONES & M. STOSKOPF: "Vibrio species as agents of elasmobranch disease." *Helgolander Meeresunters.* **37**, 309-315.
- GRIMES D.J., S.H. GRUBER & E.B. MAY: "Experimental infection of (1985) lemon sharks, *Negaprion brevirostris* (Poey), with *Vibrio* species." *J. Fish Dis.* **8**, 173-180.
- GUERINOT M.T., P.A. WEST, J.V. LEE & R.R. COLWELL: "*Vibrio* (1982) *diazotrophicus* sp. nov., a marine N₂-fixing bacterium." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 350-357.
- HADDOCK B.A. & C.W. JONES: "Bacterial respiration." (1977) *Bacteriol. Rev.* **41**, 47-99, (referert hos McPherson et al. 1984).
- HANSEN J.B. & R.H. OLSEN: "Isolation of large bacterial plasmids (1978) and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG 5." *J. Bact.* **135**, 227-238.
- HARBELL S.C., H.O. HODGINS & M.H. SCHIEWE: "Studies on the (1979) pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)." *J. Fish Dis.* **2**, 391-404.

- HARREL L.W., A.J. NOVOTNY, M.H. SCHIEWE & H.O. HODGINS:
(1976) "Isolation and discription of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington."
U.S. Fish. Wildl. Serv. Fish. Bull. 74, 447-449.
- HARRIGAN W.F. & M.E. McCANCE: "Laboratory methods in micro-
(1966) biology." Blackwell Scientific publications, 362 s.
- HICKMAN F.W., J.J. FARMER III, D.G. HOLLIS, G.R. FANNING, A.G.
(1982) STEIGEWALD, R.E. WEAVER & D.J. BRENNER:
"Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea."
J. Clin. Microbiol. 15, 395-401.
- HOLM K.O., E. STRØM, K. STENSVÅG, J. RAA & T. JØRGENSEN:
(1985) "Characteristics of a *Vibrio* sp. associated with the "Hitra disease" of Atlantic salmon in Norwegian fish farms."
Fish Pathol. 20 (nr. 2/3; i trykken)
- HUDSON L. & F.C. HAY: "Practical immunology."
(1980) Blackwell Scientific publications, 360 s.
- HUNT L.K., T.L. OVERMAN & R.B. OTERO: "Role of pH in oxidase
(1981) variability of *Aeromonas hydrophila*."
J. Clin. Microbiol. 13, 1054-1059.
- HÅSTEIN T. & T.T. POPPE: "Hemorrhagisk syndrom."
(1983) Norsk Fiskeoppdrett nr. 1, 9-15.
- HÅSTEIN T. & S.O. ROALD: "Sjukdommer og sjukdomsbekjempelse" i:
(1981) "Oppdrett av laks og aure" (red. T. Gjedrem),
s. 250-283 (Univ. forl.)
- INGRAM G.A.: "Substances involved in the natural resistance of
(1980) fish to infection - a review."
J. Fish Biol. 16, 23-60.
- JANN B., K. RESKE & K. JANN: "Heterogeneity of lipopolysaccha-
(1975) rides. Analysis of polysaccharide chain length by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis."
Eur. J. Biochem. 60, 239-246.
- JOHNSEN G.S.: "Immunological studies on *Vibrio anguillarum*."
(1977) Aquacult. 10, 221-230.
- KAHN M. & A. HOPKINS: "Restriction endonuclease cleavage maps of
(1978) bacteriophage P4 DNA."
Virology 85, 359-363.
- KAY W.W., J.T. BUCKLEY, E.E. ISHIGURO, B.M. PHIPPS, J.P.L.
(1981) MONETTE & T.J. TRUST: "Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*."
J. Bacteriol. 147, 1077-1084.

- KENT M.L.: "Characteristics and identification of *Pasteurella* and (1982) *Vibrio* species pathogenic to fishes using API-20E (Analytab Products) multitube test strips." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**, 1725-1729.
- KITAO T., T. AOKI, M. FUKUDOME, K. KAWANO, Y.O. WADA & Y. MIZUNO: (1983) "Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater in Japan." *J. Fish Dis.* **6**, 175-181.
- KITAO T., T.AOKI & K. MUROGA: "Three new O-serotypes of *Vibrio* (1984) *anguillarum*." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **50**, 1955.
- KODAMA H., M. MOUSTAFA, S. ISHIGURO, T. MIKAMI & H. IEAWA: (1984) "Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: Relationships between toxic material, hemolysin and proteolytic enzyme." *Am. J. Vet. Res.* **45**, 2203-2207.
- KORHONEN T.K., M. RHEN, V. VAISANEN-RHEN & A. PERE: "Antigenic (1984) and functional properties of enterobacterial fimbriae." *65 s. i: "Immunology of the bacterial cell envelope"* (ed.: D. Stewart-Tull), J. Wiley & Sons.
- KOVACS N.: "Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the (1956) oxidase reaction." *Nature* **178**, 703.
- KRIEG N.R. & J.G. HOLT (eds.-in-chief): "Bergeys manual of Systematic Bacteriology." Vol. I, 964 s., Williams & Wilkins, Baltimore.
- LARSEN J.L.: "*Vibrio anguillarum*: A comparative study of fish (1983) pathogenic, environmental, and reference strains." *Acta. Vet. Scand.* **24**, 456-476.
- LEVIN M.A., R.E. WOLKE & V.J. CABELLI: "*Vibrio anguillarum* as a (1972) cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*)." *Can. J. Microbiol.* **18**, 1585-1592.
- LOVE M., D. TEEBKEN-FISHER, J.E. HOSE, J.J. FARMER III, F.W. (1981) HICKMAN & G.R. FANNING: "*Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the Damselfish (*Chromis pugnax*)." *Science*, **214**, 1139-1140.
- LUGTENBERG B. & L. VAN ALPHEN: "Molecular architecture and (1983) functioning of the outer membrane of *E. coli* and other Gram-negative bacteria." *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 51-115.

- LUDERITZ G., M.A. FREUDENBERG, C. GALANOS, V. LEHMANN, E.T.
(1982) RIETCHEL & D.H. SHAW:
"Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria."
Curr. Topics Membr. Transp. **17**, 79-151.
- MACLEOD R.A.: "On the role of inorganic ions in the physiology of
(1968) marine bacteria."
Adv. Microbiol. Sea **1**, 95-126.
- MANNING P.A. & D.R. HAYNES: "A common-immunogenic *Vibrio* outer
(1984) membrane protein."
FEMS Microbiol. Lett. **24**, 297-302.
- MAUGERI T.L., E. CRISAFI, L. GENOVENESE & M.E. SCOGLIO: "Identi-
(1983) fication of *Vibrio anguillarum* with the API 20 system."
Microbiologica **1**, 73-79.
- MCPHERSON M.J., A.J. BARON, D.J.C. PAPPIN & J.C. WOTTON:
(1984) "Respiratory nitrate reductase of *Escherichia coli*.
Sequence identification of the large subunit gene."
FEBS Lett. **177**, 260-264.
- MCCABE W.R.: "Endotoxin: Microbiological, chemical, pathophysio-
(1980) logic and clinical correlations."
Sem. Infect. Dis. **3**, 38-88.
- MERREL B.R., R.I. WALKER & S.W. JOSEPH: "*In vitro* and *in vivo*
(1983) pathologic effects of *Vibrio parahaemolyticus* on human
epithelial cells."
Can. J. Microbiol. **30**, 381-388.
- MITTAL K.R., G. LALONDE, D. LEBLANC, G. OLIVIER & R. LALLIER:
(1980) "*Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relations
between virulence and surface characteristics."
Can. J. Microbiol. **26**, 1501-1503.
- MORITA R.Y.: "Psychrophilic bacteria."
(1975) Bacteriol. Rev. **39**, 144-167.
- MORRISON D.C. & R.J. ULEVITCH: "The effects of bacterial
(1978) endotoxins on host mediation systems."
Am. J. Pathol. **93**, 526-617.
- MOUSTAFA M., H. KODAMA, S. ISHIGURO, T. MIKAMI & H. IZAWA:
(1984) "Partial purification of extracellular toxic material
of fish *Vibrio*."
Am. J. Vet. Res. **45**, 2208-2210.
- MUNN C.B.: "Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*."
(1978) FEMS Microbiol. Lett. **3**, 265-268.
- MUNN C.B.: "Production and properties of a haemolytic toxin by
(1980) *Vibrio anguillarum*." i: "Fish diseases": 3rd CORAQ
Session (ed.: W. Ahne), s. 69-74, Springer Verlag.

- MUNRO A.L.S., T.S. HASTINGS, A.E. ELLIS & J. LIVERSIDE: "Studies (1980) on an ichthyotoxic material produced extracellularly by the furunculosis bacterium *Aeromonas salmonicida*." i: "Fish diseases": 3rd CORAQ Session (ed.: W. Ahne), s. 98-106, Springer Verlag.
- MUROGA K., N. YONEYAMA & Y. JO: "Vibriostatic agent-nonsensitive (1979) *Vibrio anguillarum* isolated from Ayu." (Abstr.) Fish Pathol. 13, 159-162.
- NYBELIN O.: "Studies of the fish pathogenic bacterium *Vibrio* (1935) *anguillarum*." Mitt. Anst. Binnenfisherei bei Drottningholm, Stockholm, Nr 8, s. 62.
- OHNISHI K. & MUROGA K.: "*Vibrio* sp. as a cause of disease in (1976) rainbow trout cultured in Japan. I. Biochemical characteristics." Fish Pathol. 11, 159-165.
- OLAFSEN J., M.C. RØDSETER & J. RAA: "Vibriosis on fish. Report (1975) No. 2: Biochemical and physiological studies of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*." Univ. i Tromsø, 22 s.
- OLD D.C., P.B. CRICHTON, A.J. MAUNDER & M.I. WILSON: (1980) "Discrimination of urinary strains of *Escherichia coli* by five typing methods." J. Med. Microbiol. 13, 437-444.
- OUCHTERLONY O.: "Antigen-antibody reactions in gels." (1949) Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507-515.
- PALVA E.T. & P.H. MAKELA: "Lipopolysaccharide heterogeneity in (1980) *Salmonella typhimurium* analysed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis." Eur. J. Biochem. 107, 137-143.
- POPPE T.T., T.HÅSTEIN & R.SALTE: "Hemorragisk syndrom hos laks. (1983) En oversikt." Norsk Vet. tidsskr. 95, 317-323.
- POPPE T.T., T.HÅSTEIN & R. SALTE: "'Hitra disease' (Haemorrhagic (1985a) Syndrome) in Norwegian salmon fish farming: Present status." i: "Fish and shellfish pathology" (ed.: A.E. ELLIS), s. 223-229, Academic Press.
- POPPE T.T., A. FRØSLIE, N. KOPPANG & T. HÅSTEIN: "Muskeldegenera- (1985b) sjon med eksudativ diatese hos oppdrettslaks - 'Hitrasjuke'." Norsk Vetr. tidsskr. 97, 159-165.
- RANSOM D.P., C.N. LANNAN, J.S. ROHVEC & J.L. FRYER: "Comparison (1984) of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon." J. Fish Dis. 7, 107-115.

- REICHELT J.L. & P. BAUMANN: "Taxonomy of the marine, luminous
(1973) bacteria."
Arch. Mikrobiol. 94, 283-330.
- ROSNER M.R., R.C. VERRET & H.G. KHORANA: "The structure of lipo-
(1979) polysaccharide from an *Escherichia coli* heptose-less
mutant. III. Two fatty acyl amidases from
Dictyostelium discoideum and their action on
lipopolysaccharide derivatives."
J. Biol. Chem. 254, 5926-5933.
- RØDSÆTHER M., J. OLAFSEN & J. RAA; K. MYHRE & J.B. STEEN: "Copper
(1977) as initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*)
in eel (*Anguilla anguilla*)."
J. Fish Biol. 10, 17-21.
- RØRSTAD G.: "Harskt fett i for til laks (*Salmo salar* L.):
(1985) Virkning på vekst, sykdomssymptomer og ulike blodpara-
metre med spesiell referanse til fiskens motstandsevne
mot sykdom."
Kandidatoppgave i fiskerikjemi/akvakultur, Inst. for
fiskerifag, Univ. i Tromsø. 150 s.
- SAKAI D.K.: "Heat inactivation of complements and immune
(1981a) hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho
salmon, goldfish and tilapia."
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 47, 565-571.
- SAKAI D.K.: "Spontaneous and antibody-dependent hemolysis
(1981b) activities of fish sera and inapplicability of
mammalian complement of the immune hemolysis reaction
of fishes."
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 47, 979-991.
- SAKAI D.K.: "The activation of alternative pathway by pronase,
(1983a) LPS and zymozan in the complement system of rainbow
trout serum."
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 49, 347-351.
- SAKAI D.K.: "The assessment of the health condition of salmonids
(1983b) by non-specific haemolytic (SH₅₀) activity of serum."
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 49, 1487-1491.
- SAKAI D.K.: "Lytic and bactericidal properties of salmonid sera."
(1983c) J. Fish Biol. 23, 457-466.
- SALTE R.: "Virussjukdommer hos fisk."
(1984) Norsk Vet. tidskr. 96, 603-614
- SCHIEWE M.H., J.H. CROSA & E.J. ORDAL: "Deoxyribonucleic acid
(1977) relationships among marine vibrios pathogenic to fish."
Can. J. Microbiol. 23, 954-958.
- SCHIEWE M.H., T.J. TRUST & J.H. CROSA: "*Vibrio ordalii* sp. nov.:
(1981) A causative agent of vibriosis in fish."
Curr. Microbiol. 6, 343-348.

- SCHIEWE M.H., T.J. TRUST & J.H. CROSA: "Validity of the (1982) publication of new names and new combinations previously published outside the IJSB." Int. J. Syst. Bacteriol. **32**, 384-385.
- SCHIEWE M.H.: "*Vibrio ordalii* as a cause of vibriosis in salmonid (1983) fish." i: "Bacterial and viral diseases of fish. Molecular studies." (ed.: J.H. Crosa), s.31-40.
- SHIEH H.S. & J.R. MACLEAN: "Blood changes in brook trout induced (1976) by infection with *Aeromonas salmonicida*." J. Wild. Dis. **12**, 77-83.
- SHINODA S., R. KARIYAMA, M. OGAWA, Y. TAKEDA & T. MIWATANI: (1976) "Flagellar antigens of various species of the genus *Vibrio* and related genera." Int. J. Syst. Bacteriol. **26**, 97-101.
- SHINODA S., T. SENOH, K. ASANO, N. NAKAHARA & B.-I. ONO: (1980) "Differences between surface antigenic determinants of polar monotrichous flagella of *Vibrio parahaemolyticus* and of related species." Microbiol. Immunol. **24**, 409-418.
- SINDERMANN C.J.: "Disease in marine aquaculture." (1984) Helgolander Meeresunters. **37**, 505-532.
- SJØBLAD R.D., R.N. DOETSCH & C.W. EMALA: (Short communication:) (1985) "Novel function of eubacterial flagella: role in aggregation of a marine bacterium." Arch. Microbiol. **142**, 101-102.
- SMITH I.W.: "A disease of finnic due to *Vibrio anguillarum*." (1961) J. Gen. Microbiol. **24**, 247-252.
- SNIESZKO S.F.: "The effects of environmental stress on outbreaks (1974) of infectious diseases of fishes." J. Fish Biol. **6**, 197-208.
- STEIN M.T., R.J. SIEBLING & A.D. LARSON: "H-antigen relationships (1984) among several *Vibrio* species." i: "Vibrios in the environment" (ed.: R.R. Colwell), kap. 4, s. 73-82, J. Wiley & Sons.
- STOCK J.B., B. RAUCH & S. ROSEMAN: "Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*." (1977) J. Biol. Chem. **252**, 7850-7861.
- STRØM A.R., J.A. OLAFSEN & H. LARSEN: "Trimethylamine oxide: A (1979) terminal electron acceptor in anaerobic respiration of bacteria." J. Gen. Microbiol. **112**, 315-320.

- STYRVOLD O.: "Studier over oksydativ fosforylering koplet til reduksjon av trimetylaminoksyd i cellefritt ekstrakt av *Proteus* NTHC 153."
(1981) Hovedoppgave ved IFF, Univ. i Tromsø, 133 s.
- SUNDARAM S. & K.V. MURTHY: "Occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridin (O/129) resistance in human isolates of *Vibrio cholerae*."
(1983) FEMS Microbiol. Lett. **19**, 115-117.
- TANAKA J., H. FUJIWARA & M. TORISU: "Vitamin E and immune response. I. Enhancement of helper T-cell activity by dietary supplementation of vitamin E in mice."
(1979) Immunol. **38**, 727-734.
- TASSIN M.G., R.J. SIEBLING, N.C. ROBERTS & A.D. LARSON:
(1983) "Presumptive identification of *Vibrio* species with H-antiserum."
J. Clin. Microbiol. **18**, 400-407.
- THAUER K.R., K. JUNGERMANN & K. DECKER: "Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria."
(1977) Bacteriol. Rev. **41**, 100-180.
(Referert hos Styrvold 1981).
- TOLMAZKY M.E. & J.H. CROSA: "Molecular cloning and expression of genetic determinants for the iron uptake system mediated by the *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1."
(1984) J. Bacteriol. **160**, 860-866.
- TORANZO A.E., J. BARJA, R.R. COLWELL & F.M. HETRICK: "Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens."
(1983) Infect. Immun. **39**, 184-192.
- TRUST T.J., S.P. HOWARD, J.B. CHAMBERLAIN, E.E. ISHIGURO & J.T. BUCKLEY:
(1980) "Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical *Aeromonas salmonicida*."
FEMS Microbiol. Lett. **9**, 35-38.
- TRUST T.J., I.D. COURTICE, A.G. KHOURI, J.H. CROSA & M.H. SCHIEWE:
(1981) "Serum resistance and hemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish."
Infect. Immun. **34**, 702-707.
- TSAI C.-M., R. BOYKINS & C.E. FRASCH: "Heterogeneity and variation among *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides."
(1983) J. Bacteriol. **155**, 498-504.
- UDEY L.R. & J.L. FRYER: "Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*."
(1978) Mar. Fish. Rev. **40**, 12-17.

- VALLA S., D.H. COUCHERON & J. KJOSBAKKEN: "*Acetobacter xylinum*
(1983) contains several plasmids: Evidence for their involvement in cellulose formation."
Arch. Microbiol. **134**, 9-11.
- WARD P.D., C.A. WATERS & K.J. SWEENEY: "Autoaggregation of virulent *Aeromonas salmonicida* strains lacking additional surface layer." i: "Fish and Shellfish Pathology" (ed.: A.E. Ellis), kap. 12, Academic Press, London.
- WATSON R.R. & T.M. PETRO: "Moderate nutritional stress and humoral immunity, cellular immunity, and resistance to bacterial infection."
FEMS Microbiol. Lett. **10**, 297-315.
- WEDEMAYER G. & K. CHATTERTON: "Some blood chemistry values for the juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)."
J. Fish. Res. Board Can. **28**, 606-608.
- WEST P.A. & R.R. COLWELL: "Identification and classification of *Vibrionaceae* - an overview." i: "Vibrios in the environment" (ed. R.R. Colwell), kap. 20, s. 285-363, J Wiley & Sons.
- WESTON P.D. & R. SCORER: "Comparison of sepharose and cellulose as a support for antibody and antigen." i: "Affinity chromatography" (eds.: O. Hoffmann-Ostenhof et al.), s. 207-210, Pergamon Press.
- ØRSKOV F. & I. ØRSKOV: "Serotyping of *E. coli*."
(1984) Meth. Microbiol. **14**, 43-112.

APPENDIX A.

TABELL A 2.1 Type-TEO-bakteriers evne til fermentering (syreproduksjon) av karbohydrater og noen derivater av slike (n=20).

	mg/ml	1 DØGN	4 DØGN	6 DØGN	RESULTAT
Triose:					
Glyserol	x 11.90	- (16/20)	+ (18/20)	+ (18/20)	+ (18/20)
Tetrose:					
Erythritol	x 10.30	-	-	-	-
Pentoser:					
Adonitol (ribitol)	x 9.70	-	-	-	-
D-Arabinose	10.00	-	-	-	-
L-Arabinose	10.00	-	-	-	-
D-Arabitol	x 10.00	-	-	-	-
L-Arabitol	x 10.00	-	-	-	-
D-Lyxose	10.00	-	-	-	-
Ribose	10.00	- (12/20)	+	+	+
Xylitol	x 10.00	-	-	-	-
D-Xylose	10.00	-	-	-	-
L-Xylose	10.00	-	-	-	-
Heksoser:					
Dulcitol (galaktitol)	x 9.71	-	-	-	-
D-Fruktose	10.00	+	+	+	+
D-Fukose	9.14	-	-	-	-
L-Fukose	9.14	-	-	-	-
D-Galaktose	10.00	+	+ (11/20)	(16/20)	+ (!?)
Glukonat	x 13.14	+	+	+	+
2-keto-glukonat	x 14.86	-	-	-	-
5-keto-glukonat	x 12.24	-	-	-	-
D-Glukose	10.00	+	+	+	+
Inositol	10.00	-	-	-	-
D-Mannitol	x 9.71	+	+	+	+
D-Mannose	10.00	+	+	+	+
L-Rhamnose	9.71	-	-	-	-
D-Sorbitol	x 9.71	-	-	-	-
L-Sorbose	10.00	-	-	-	-
D-Tagatose	10.00	-	-	-	-
Disakkarider:					
D-Cellulose	9.42	+	+	+	+
Gentiobiose	3.55	-	+ (14/20)	+ (19/20)	+ (19/20)
Laktose	10.00	-	-	-	-
D-Maltose	10.00	-	-	(19/20)	-
Melibiose	9.42	-	-	-	-
Sukrose	9.42	-	-	-	-
Trehalose	9.42	+	+	+	+
D-Turanose	9.42	-	-	-	-
Trisakkarider:					
Melezitose	9.42	-	-	-	-
Raffinose	11.14	-	-	-	-
Polysakkarider:					
Glykogen	9.14	-	-	-	-
Inulin	9.14	-	-	-	-
Stivelse (Amidon)	9.14	-	-	-	-
Glukosider:					
Amygdalin	7.71	-	-	-	-
Arbutin	7.71	-	-	-	-
Esculin	8.29	-	-	-	-
Salicin	9.42	-	-	-	-
-metyl-glukosid	9.14	-	-	-	-
Andre:					
N-acetyl-glukosamin	9.14	+	+	+	+
-metyl-mannosid	9.14	-	-	-	-
-metyl-xylosid	9.15	-	-	-	-
ONPG (orto-nitrofenyl-beta-D-galaktopyranosid	1.0	-	-	-	-

TABELL A 2.2 (etter BAUMANN et al. 1984)

A.

Differential characteristics of the species and biocars of the genus *Vibrio*^a

Characteristics	1. <i>V. cholerae</i>	2. <i>V. morskankovii</i>	3. <i>V. parvii</i>	4. <i>V. anguillarum</i>	5. <i>V. anguillarum</i> I	6. <i>V. anguillarum</i> II	7. <i>V. anguillarum</i> III	8. <i>V. anguillarum</i> IV	9. <i>V. anguillarum</i> V	10. <i>V. anguillarum</i> VI	11. <i>V. anguillarum</i> VII	12. <i>V. anguillarum</i> VIII	13. <i>V. anguillarum</i> IX	14. <i>V. anguillarum</i> X	15. <i>V. anguillarum</i> XI	16. <i>V. anguillarum</i> XII	17. <i>V. anguillarum</i> XIII	18. <i>V. anguillarum</i> XIV	19. <i>V. anguillarum</i> XV	20. <i>V. anguillarum</i> XVI	21. <i>V. anguillarum</i> XVII	22. <i>V. anguillarum</i> XVIII	23. <i>V. anguillarum</i> XIX	24. <i>V. anguillarum</i> XX	
Number of strains tested	161	6	91	44	134	38	8	15	6	15	7	4	15	7	4	14	20	5	12	11	1	1	1	2	
Flagellation:																									
3-12 Polar flagella	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lateral flagella when grown on solid media	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Swarming on solid complex media	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Straight rods ^b	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PHB-accumulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentation:																									
Yellow-orange	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blue-black	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Luminescence	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of acetoin and/or diacetyl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na ⁺ required for growth	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Requirement for organic growth factors	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at:																									
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of:																									
Amylase	+	+	+	+	+	+	d	+	-	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alginate	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chitinase	+	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of:																									
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	d	-	d	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	d	d	+	d	d	d	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	+	d	-	-	d	+	-	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	d	-	-	-	-	d ¹	-	-	-	-	-	d ¹	d ¹	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	d	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronate	-	-	+	-	d	-	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galacturonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propionate	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valerate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heptanoate	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutarate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Malate	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Hydroxybutyrate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	d	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Ketoglutarate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	-	+	d	+	+	+	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
meso-Inositol	-	d	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxybenzoate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	-	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-α-Alanine	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Alanine	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Serine	d	+	+	d	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucine	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ-Aminobutyrate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
δ-Aminovalerate	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidine	d	d	d	-	+	+	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Tyrosine	-	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Putrescine	-	-	-	+	d	+	+	+																	

B.

Additional characteristics of species and biovars of *Vibrio*^a

Characteristics	1. <i>V. cholerae</i> ^a	2. <i>V. parahaemolyticus</i>	3. <i>V. parahaemolyticus</i> ^b	4. <i>V. parahaemolyticus</i> ^c	5. <i>V. parahaemolyticus</i> ^d	6. <i>V. parahaemolyticus</i> ^e	7. <i>V. parahaemolyticus</i> ^f	8. <i>V. parahaemolyticus</i> ^g	9. <i>V. parahaemolyticus</i> ^h	10. <i>V. parahaemolyticus</i> ⁱ	11. <i>V. parahaemolyticus</i> ^j	12. <i>V. parahaemolyticus</i> ^k	13. <i>V. parahaemolyticus</i> ^l	14. <i>V. parahaemolyticus</i> ^m	15. <i>V. parahaemolyticus</i> ⁿ	16. <i>V. parahaemolyticus</i> ^o	17. <i>V. parahaemolyticus</i> ^p	18. <i>V. parahaemolyticus</i> ^q	19. <i>V. parahaemolyticus</i> ^r	20. <i>V. parahaemolyticus</i> ^s
Growth at:																				
20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of:																				
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetate	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butyrate	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isobutyrate	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isovalerate	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caproate	+	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprylate	+	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pelargonate	d	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caprate	d	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fumarate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dl-Glycerate	d	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aconitate	+	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propanol	-	-	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylacetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycine	-	-	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Threonine	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Aspartate	d	+	d	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
L-Arginine	+	+	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ornithine	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Citrulline	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a For symbols see standard definitions

^b These species or biovars are not able to utilize the following organic compounds as sole or principal sources of carbon and energy: D-arabinose, D-fucose, inulin, cellulose, saccharate, mucate, formate, oxalate, maleate, adipate, pimelate, suberate, azelate, sebacate, D-tartrate, meso-tartrate, glycolate, laevulinate, citraconate, itaconate, mesaconate, adonitol, ethylene glycol, propylene glycol, 2,3-butanediol, methanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, D-mandelate, L-mandelate, benzoyl formate, o-hydroxybenzoate, m-hydroxybenzoate, phenylethanediol, phenol, naphthalene, L-isoleucine, L-norleucine, L-valine, L-lysine, L-phenylalanine, L-tryptophan, D-tryptophan, anthranilate, m-aminobenzoate, p-aminobenzoate, methylamine, ethanolamine, benzylamine, histamine, tryptamine, butylamine, α-amylamine, 2-amylamine, pentylamine, creatine, pantothenate, acetamide, nicotinate, nicotinamide, trigonelline, allantoin, adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil and n-dodecane

^c This biovar is not able to utilize the following organic compounds as sole sources of carbon and energy: adipate, pimelate, suberate, azelate, sebacate, adonitol, m-hydroxybenzoate, phenylacetate, L-isoleucine, L-valine and L-lysine

C.

Identification of *Vibrio* species and allied genera likely to be encountered in clinical laboratories^a

Characteristics	1. <i>V. cholerae</i>	2. <i>V. parahaemolyticus</i>	3. <i>V. parahaemolyticus</i> ^b	4. <i>V. parahaemolyticus</i> ^c	5. <i>V. parahaemolyticus</i> ^d	6. <i>V. parahaemolyticus</i> ^e	7. <i>V. parahaemolyticus</i> ^f	8. <i>V. parahaemolyticus</i> ^g	9. <i>V. parahaemolyticus</i> ^h	10. <i>V. parahaemolyticus</i> ⁱ	11. <i>V. parahaemolyticus</i> ^j	12. <i>V. parahaemolyticus</i> ^k	13. <i>V. parahaemolyticus</i> ^l	14. <i>V. parahaemolyticus</i> ^m	<i>Aeromonas</i>	<i>Photobacterium</i>
Thornley arginine ^a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
Ornithine decarboxylase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+
Glucose gas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
L-Arabinose acid	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Inositol acid	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Salicin acid	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Sucrose acid	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Voges-Proskauer (24 h)	d	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
ONPG hydrolysis (24 h)	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Growth at 43°C	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Inhibition by 0/129 phosphate ^b :																
10 µg	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	d
150 µg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Growth in 7 NaCl:																
0	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	-	d	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
Oxidase (Kovacs')	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₂ ⁻ to NO ₃ ⁻	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on TCBS	Y	G	Y/G	G	G	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	-	-

^a For symbols see standard definitions; also S sensitive; R resistant; Y yellow; and G, green.

^b To differentiate *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii* and *V. vulnificus* adequately it may be necessary to test for growth on cellobiose gluconate, ethanol, L-serine, L-leucine, L-glutamate, and putrescine (see Table 5.58)

^c To differentiate *V. fluvialis* biovars I and II adequately it is necessary to test for growth on δ aminovalerate, putrescine, glutarate and glucuronate (see Table 5.58)

^d See text for discussion of the problems associated with the Thornley method.

^e 0/129 phosphate: 2,4-diamino-6,7-disopropylpteridine phosphate.

TABELL A 3.1 Serologi-tabell - samtlige bakterier:

Bakterier:	Kanin antistoffer mot:			Antall RIA	Alternative betegnelser/ kommentarer:
	A 3.1	NCMB 2129	TEO 83.001		
TEO 83.001	2.2	1.2	10.5	(12)	SD: 1.1/0.6/1.4
TEO 84.020	1.9	0.8	14.1	(2)	
TEO 84.021	3.9	2.4	15.9	(1)	
TEO 84.022	3.1	2.0	11.4	(1)	
TEO 84.023	3.9	2.4	9.8	(1)	
TEO 84.024	3.0	0.9	14.6	(1)	
TEO 84.025	1.7	1.1	11.7	(1)	
TEO 84.026	6.6	3.7	16.7	(1)	
TEO 84.028	1.5	1.0	11.4	(1)	
TEO 84.029	6.0	2.7	14.5	(1)	
TEO 84.031	1.0	0.1	7.5	(1)	
HI-7751	3.4	1.3	10.4	(4)	Havforskn.inst.
B 1	-	6.2	11.3	(1)	B indikerer at
B 2	1.5	0.7	15.5	(1)	bakteriene er
B 3	3.1	1.1	10.7	(1)	isolert i nær-
B 4	1.3	0.4	13.4	(1)	heten av Bergen.
B 5	-	4.3	7.7	(1)	(E. Egidius)
B 6	3.0	0.8	16.3	(1)	(fra ørret)
Vibrio anguillarum:					
A 3.1	17.0	2.6	2.2	(4)	A=Austervoll
NCMB 6	14.3	7.5	2.7	(2)	ATCC 19264
H-F	0.9	13.5	7.2	(3)	"Hitra-Frøya"
NCMB 2129	5.0	16.7	13.4	(5)	HI-10, Bergen
Vibrio ordalii:					
DF ₁ K	0.3	0	0	(2)	Vibrio sp. 1669
MSC2-75	0	0	0	(1)	
Veterinærisolater:					
42.222/83	3.1	1.6	14.6	(1)	(Isolater fra
42.309/83	2.5	1.0	9.1	(1)	Trygve Poppe).

TABELL A 3.2 Tabellen viser i hvilken grad kaninanti- stoffer produsert mot tre *Vibrio*-bakterier (ab_1) bindes til overflaten av *Vibrio* sp. TEO-bakterier. Tallene representerer bundet radioaktivitet ($^{125}\text{I-ab}_2$) i prosent av total mengde tilsatt.

Bakterier	Kanin-antisera		
	A 3.1	NCMB 2129	TEO 83.001
<i>Vibrio</i> sp. TEO (n=20)	2.8 (1.2)*	1.6 (1.2)	11.9 (2.6)
Nord (n=6)	2.6 (1.6)	1.5 (0.7)	11.1 (1.9)
Midt (n=7)	2.9 (0.8)	1.5 (0.7)	13.0 (2.5)
Vest (n=7)	2.8 (0.9)	1.8 (1.8)	11.6 (2.6)

Ab_1 -fortynning: 1/1500

*) Tallene i parentes er standardavvik (S.D.)

TABELL A 3.3 I tabellen er bindingsprosenten for korresponderende antiserum-bakterie satt til 100%. De øvrige tall er relative størrelser.

Bakterier	Kanin-antisera		
	A 3.1	NCMB 2129	TEO 83.001
<i>V. anguillarum</i>			
A 3.1	100.0	15.6	20.8
NCMB 6	84.1	44.9	25.5
NCMB 2129	29.4	100.0	126.4
H-F	5.3	80.8	67.9
84-2018 (1-6)	2.9	3.0	2.7
<i>V. ordalii</i>			
DF1K	1.7	0.0	0.0
MSC2-75	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i> sp. TEO *)			
TEO 83.001	13.0	7.2	100.0
TEO-total (n=20)	16.4	9.6	113.3
Nord (n= 6)	15.3	9.0	104.7
Midt (n= 7)	17.1	9.0	122.6
Vest (n= 7)	16.4	10.8	109.4

*) Gjennomsnittsverdiene fra tabell A 3.2 danner grunnlaget for tallene.