

oppdragsmelding

Bakterien *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* som en analog for en unnsluppet gen-modifisert bakterie: biologi, spredning og felt-innsamling

Rita Hartvigsen Daverdin
Odd Halvorsen



NINA

NORSK INSTITUTT FOR NATURFORSKNING

Bakterien *Aeromonas salmonicida*
subsp. *salmonicida* som en analog
for en unnsluppet gen-modifisert
bakterie: biologi, spredning
og felt-innsamling

Rita Hartvigsen Daverdin
Odd Halvorsen

NINAs publikasjoner

NINA utgir fem ulike faste publikasjoner:

NINA Forskningsrapport

Her publiseres resultater av NINAs eget forskningssarbeid, i den hensikt å spre forskningsresultater fra institusjonen til et større publikum. Forskningsrapporter utgis som et alternativ til internasjonal publisering, der tidsaspekt, materialets art, målgruppe m.m. gjør dette nødvendig.

NINA Utredning

Serien omfatter problemoversikter, kartlegging av kunnskapsnivået innen et emne, litteraturstudier, sammenstilling av andres materiale og annet som ikke primært er et resultat av NINAs egen forskningsaktivitet.

NINA Oppdragsmelding

Dette er det minimum av rapportering som NINA gir til oppdragsgiver etter fullført forsknings- eller utredningsprosjekt. Opplaget er begrenset.

NINA Temahefter

Disse behandler spesielle tema og utarbeides etter behov for å informere om viktige problemstillinger i samfunnet. Målgruppen er "almenheten" eller særskilte grupper, f.eks. landbruket, fylkesmennenes miljøvernavdelinger, turist- og friluftlivskretser o.l. De gis derfor en mer populærfaglig form og med mer bruk av illustrasjoner enn ovennevnte publikasjoner.

NINA Fakta-ark

Hensikten med disse er å gjøre de viktigste resultatene av NINAs faglige virksomhet, og som er publisert andre steder, tilgjengelig for et større publikum (presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivåer, politikere og interesserte enkeltpersoner).

I tillegg publiserer NINA-ansatte sine forskningsresultater i internasjonale vitenskapelige journaler, gjennom populærfaglige tidsskrifter og aviser.

Daverdin, Rita Hartvigsen & Halvorsen, Odd. 1994. Bakterien *aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* som en analog for en unnsloppet gen-modifisert bakterie: biologi, spredning og felt-innsamling. NINA Oppdragsmelding 293: 1-28.

Trondheim, juni 1994

ISSN 0802-4103
ISBN 82-426-0491-6

Rettighetshaver ©:
NINA Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

Redaksjon: Odd Terje Sandlund

NINA, Trondheim

Design og layout: Hilde Meland

Sats: NINA

Kopiering: Norservice

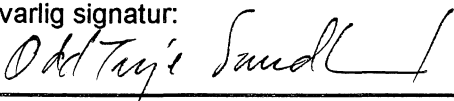
Opplag: 150

Kontaktadresse:
NINA
Tungasletta 2
7005 Trondheim
Tel: 73 58 05 00

Tilgjengelighet: Åpen

Prosjekt nr.: 6902

Ansvarlig signatur:



Oppdragsgiver:

Direktoratet for naturforvaltning
Norges Forskningsråd

Referat

Rapporten gir en gjennomgang av den kunnskapen som finnes om biologien til bakterien *Aeromonas salmonicida* og dens "typiske" og "atypiske" former. Denne bakterien fremkaller blant annet sykdommen furunkulose hos laksefisk. Dette er en bakterie som har hatt stor økonomisk betydning for oppdrett av laksefisk. Den er dermed godt beskrevet og det er utført mye basal forskning på bakteriens biologi. Den vil derfor egne seg som en analog eller modellorganisme for en unnsluppet GMO.

Vi har analysert de tre best beskrevne spredningsforløpene til sykdommen furunkulose ved å tegne kart over spredning i diskrete tidssteg. Denne analysen antyder at bakterien kunne forflytte seg omlag 300 kilometer mellom hver påvisning, men kunne også forflytte seg betydelig lengre.

Gjennomgangen av bakteriens biologi danner bakgrunn for å se på hvilke spørsmål som man med dagens kunnskapsnivå kan besvare. Blant de spørsmål DN krever besvart ved en konsekvensutredning ved utsetting av GMO til miljøet. Denne gjennomgangen viste at selv for denne godt studerte bakterien var det stor mangel på økologisk kunnskap. En målsetting om påvisning og utryddelse av en unnsluppet GMO analog til *A. s. salmonicida* vil kreve et så omfattende overvåkingprogram at det ikke vil være praktisk gjennomførbart. Derfor må man anta at med den kunnskapen vi har idag vil det være nesten umulig å få kontroll over en unnsluppet GMO analog til *A. s. salmonicida*.

Emneord *Aeromonas salmonicida* - økologi - spredning - genmodifiserte organismer - utilsiktet utslipp - feltinnsamling

Rita Hartvigsen Daverdin, NINA, Tungasletta 2, N-7005 Trondheim.
Odd Halvorsen, Zoologisk Museum, Universitetet i Oslo, Sarsgt. 1, N-0562 Oslo.

Abstract

This report reviews present biological knowledge of the bacterium *Aeromonas salmonicida* and its typical and atypical forms. This bacterium causes diseases in fish and because of the economic importance of the diseases, the biology is fairly well known. In our opinion, this bacterium is a good analogue for an accidentally released living modified organism (LMO).

We have carried out an analysis of the three best described range extensions of the disease furunculosis in salmonids which is caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, by drawing maps of the geographical distribution of the disease in discrete time-steps. This analysis showed that furunculosis normally "jumped" 300 kilometers between sites, but could also be found at considerably longer distances from the last outbreak. Whether this was a result of only anthropocor (human-aided) range extension could not be determined.

Our review of the biology of *A. s. salmonicida* was used to examine to what degree we would have been able to answer questions that should be answered if this was an organism that we wanted to release into the environment, or that was unintentionally released. The analysis showed that, even for this relatively well-studied organism, there is still a paucity of ecological knowledge. To stop a range extension, and exterminate a LMO analogous to *A. s. salmonicida* would require a sampling-program of such dimensions that, in most cases, it would be impossible to implement. Therefore, with our present-day knowledge, an unintentional release of a LMO analogous to *A. s. salmonicida* would, most likely, be out of control from the moment the organism has reached the environment.

Key words *Aeromonas salmonicida* - ecology - range-extension - genetically engineered organisms - unintentional release - fieldsampling

Rita Hartvigsen Daverdin, NINA, Tungasletta 2, N-7005 Trondheim.
Odd Halvorsen, Zoologisk Museum, Universitetet i Oslo, Sarsgt. 1, N-0562 Oslo.

Forord

DN-rapport 1991-7 avgitt av en faggruppe oppnevnt for DN for å belyse forholdet mellom den moderne bioteknologi og det ytre miljø konkluderte med at innenfor instituttsektoren (4NI) burde et sterkt økologimiljø suppleres med kompetanse for å kunne ta utrednings- og forskningsoppdrag for forvaltningen i tilknytning til utsetting og utslipp av GMO og andre stedfremmede organismer. På dette grunnlaget fremmet NINA et prosjektforslag om kompetanseoppbygging med det siktemål å kombinere økologisk epidemiologi og mikrobiologi. Arbeidet med denne rapporten representerer det første trinn i en slik kompetanseoppbygging.

Trondheim, juni 1994
Rita Hartvigsen Daverdin
Odd Halvorsen

Innhold

Referat	3
Abstract	3
Forord	4
Innledning	5
1. <i>A. salmonicida</i> . Systematikk, autøkologi, vert-parasitt forhold og påvisning.....	5
1.1 Systematikk.....	5
1.2 Autøkologi.....	5
1.3 Vert-parasitt forhold mellom <i>A. salmonicida</i> og fisk	6
1.4 Påvisning av <i>A. s. salmonicida</i>	7
2. <i>A. s. salmonicida</i> ; spredning og geografisk utbredelse.....	8
2.1 En historisk oversikt over kjente forekomster av furunkulose og <i>A. s. salmonicida</i>	8
2.2 Spredningsmekanismene til <i>A. s. salmonicida</i> ..	9
3. Spredningsforløpet til <i>A. s. salmonicida</i> i Storbritannia, Sverige og Norge.	10
3.1 Furunkulose i lakse-vassdrag i Storbritannia. .	10
3.2 Furunkulose i svenske kultiveringsanlegg	10
3.3 Furunkulose i norske oppdrettsanlegg og vassdrag	10
4. Økologisk kunnskap i forhold til konsekvensutredning for GMO	21
5. Diskusjon. Hva gjør man hvis...?	23
6. Konklusjoner	25
Litteratur	26

Innledning

Det er frykt for utilsiktet utslipp av gen-modifiserte organismer (GMO) i naturen i forbindelse med bruk av GMO i landbruk, industri, akvakultur, ved biologisk nedbryting av avfall og i human- og veterinærmedisin (DN, 1991). Det foreligger foreløpig ingen omfattende erfaring med GMO i naturen. I de utredninger som er foretatt internasjonalt om potensielle miljø-effekter av utsetting og utilsiktet utslipp av gen-modifiserte organismer er det derfor lagt stor vekt på erfaringer etter introduksjoner av stedfremmede arter til nye lokaliteter i naturmiljøet (Mooney og Bernardi 1990, DN 1991).

I forbindelse med bruk av GMO er målsettingen å hindre spredning til naturen. Om slik spredning skulle skje, må man ha metoder for å påvise og fjerne GMO fra naturen igjen. Kunnskap om organismenes spredningsbiologi og metoder for å påvise dem er helt fundamental for å vurdere realismen i denne målsettingen.

Formålet med dette prosjektet har vært å samle og vurdere den litteraturen som foreligger om spredningen til bakterien *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* som forårsaker furunkulose hos fisk. Hensikten har vært å bruke dette til å drøfte hvilke metoder som vil kunne være aktuelle for eventuelt å få kontroll over en analog unnsloppet GMO.

Rapporten er bygd opp med seks hoveddeler: I den første delen (1) har vi samlet informasjon fra litteraturen om taksonomiske forhold for bakterien *A. salmonicida*, om dens autøkologi og forhold til vertsfiskene. I tillegg ser vi på hvilke metoder som finnes for å påvise bakterien. I den andre delen (2) gjengir vi bakteriens utbredelsehistorie, og i den tredje delen (3) gjør vi en egen kartografisk analyse av spredningen slik den er angitt å ha forløpt på de Britiske øyer, i Sverige og i Norge. I den fjerde delen (4) ser vi på i hvilken grad økologisk relevante spørsmål i "Spørsmål som skal besvares i en konsekvensutredning ved utsetting av genmodifiserte organismer (GMO) til miljøet" utarbeidet av DN juni 1993 kan besvares på dette grunnlaget. I den femte delen (5) drøfter vi hvilke elementer og hvilket omfang et opplegg for påvisning av en analog GMO som har unnsloppet til naturen må ha, og i del seks (6) trekker vi konklusjoner om mulighetene for påvisning og kontroll av en unnsloppet GMO.

1. *A. salmonicida*. Systematikk, autøkologi, vert-parasitt forhold og påvisning.

1.1 Systematikk.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.1 (Krieg og Holt 1984) gir følgende plassering av bakterien:

Familie: Vibrionaceae

Slekt: *Aeromonas*

- Arter: 1. *A. hydrophila* (frosk, fisk, pattedyr)
2. *A. caviae* (ferskvann og kloakk, på fisk)
3. *A. sobria* (ferskvann og kloakk, på fisk)
4. *A. salmonicida* (salmonider og andre fisk)
a) *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*
(produserer brunt pigment)
b) *A. salmonicida* subsp. *achromogens*
(produserer ikke brunt pigment)
c) *A. salmonicida* subsp. *masoucida*
(produserer ikke brunt pigment)

McCarthy og Roberts (1980) foreslo følgende klassifisering av *A. salmonicida*:

Gruppe 1: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*
(pigmentproduserende, hos salmonider).

Gruppe 2: *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (ikke pigmentproduserende, hos salmonider = atypisk).

Gruppe 3: *A. salminicida* subsp. *nova* (atypiske strains isolert fra ikke-salmonider).

En betydelig diskusjon pågår i litteraturen rundt plasseringen av *A. salmonicida* og dens underarter (Austin og Austin 1987). Skillet mellom typisk og atypisk *A. salmonicida* går på hvorvidt bakterien produserer brunt pigment på agarplate. Den første beskrivelsen av *A. s. salmonicida* var en stav-formet, gramnegativ bakterie som produserte brunt pigment når den ble dyrket på f.eks. blodagar. Evelyn (1971) fremsatte en hypotese om at pigment-produksjonen kan være et ustabil trekk, fordi hun fant at etter 2 år i kultur mistet bakterie-stammen evnen til pigment-produksjon.

1.2 Autøkologi.

Faktorer som har vært antatt å være svært viktige for å skape vekstforhold for *A. s. salmonicida* er høy vanntemperatur, lav vannstand, stor tetthet av fisk knyttet til f.eks. oppvandring av laks eller gyting (bl.a.

Mackie et al. 1930, 1933, 1935). Først var det antatt at *A. s. salmonicida* bare kunne leve i ferskvann, men Scott (1968) viste at bakterien også kan overleve i sjøvann og brakkvann. Den er nå svært vanlig i marint oppdrett av laksefisk (og andre fiskearter).

Mackie et al. (1930) uttalte at *A. s. salmonicida* kunne finnes i alle typer elver.

Ulike undersøkelser viser at utbrudd starter ved temperaturer mellom 10 og 15°C (Mackie et al. 1930, Ljungberg og Johansson 1977, Wichardt et al. 1989). Paterson et al. (1980) fant at optimum vekst hos bakterien var ved 28°C, men fant ingen vekst ved 37°C.

Det diskuteres hvorvidt at bakterien er en obligat fiskepatogen eller om den kan være frittlevende i enkelte faser. Eksperimenter har vist at bakterien kan leve i ferskvann i 26 døgn (McCarthy 1977), og i saltvann i 5-7 døgn (Rose et al. 1990). Andre eksperimenter har vist at bakterien kan overleve i bunnslam og avføringsrester i mer enn 10 dager, og også på fiskehåver og annet oppdrettsutstyr i mer enn 5 dager (McCarthy 1977). Dubois-Darnaudpeys (1977) viste at bakteriens overlevelse i ferskvann var avhengig av både pH i vannet og vannetemperatur. Levende celler av bakterien kan isoleres fra død fisk inntil 30 dager etter at fisken er død (McCarthy og Roberts 1980). Andre forsøk har indikert at bakterien kanskje går inn i et stadium hvor bakterie-cellene er levende, men ikke istand til å vokse på et vanlig dyrkningsmedium (Austin og Austin 1987).

1.3 Vert-parasitt forhold mellom *A. salmonicida* og fisk

Tradisjonelt har det vært antatt at *A. s. salmonicida* bare angriper arter i familien Salmonidae, men over årene har nye verter kommet til i flere familier av fisk (Austin og Austin 1987).

I tillegg til artene i familien Salmonidae, hovedsaklig laks (*Salmo salar*), ørret (*Salmo trutta*) og røye (*Salvelinus alpinus*), er bakterien påvist hos ørekyt (*Phoxinus phoxinus*), gullfisk (*Carassius auratus*), karpe (*Cyprinus carpio*), brasme (*Abramis bramae*), mort (*Rutilus rutilus*), gullbust (*Leuciscus leuciscus*), stam (*Leuciscus cephalus*), suter (*Tinca tinca*), gjedde (*Esox lucius*), abbor (*Perca fluviatilis*) og noen nord-amerikanske fiskearter (Austin og Austin 1987).

Klassisk furunkulose forårsaket av *A. s. salmonicida* gir sår på fiskeskinnet med typiske furunkler eller byller i muskelvevet hvor huden etterhvert forsvinner, dette kalles nå den akutte form av furunkulose. Denne gir også mørkpigmentering av fisken, i tillegg til blødninger ved basis av finnene. Denne formen gir

vanligvis høy dødelighet. I tillegg er det en kronisk, "sub-acute" form som man vanligvis ser hos eldre fisk, som gir seg uttrykk i nedsatt svømmeaktivitet, blodskutte finner, blødninger i muskelvev og annet vev, oppsvulming av pancreas og nekrose i nyrene. Den siste formen har vanligvis lavere dødelighet, og fisken kan slå tilbake infeksjonen og bli helt frisk (Austin og Austin 1987). I tillegg til disse to mest vanlig beskrevne formene, har McCarthy og Roberts (1980) beskrevet en "peracute" furunkulose som oftest påvises på yngel. Fisken får mørkpigmentering, og kan dø fort uten andre synlige ytre tegn på sykdom. Denne formen kan gi svært høy dødelighet i oppdrettsanlegg. Amlacher (1961) diskuterte en fjerde form av furunkulose som han kalte tarmfurunkulose. Dette er en kronisk form for furunkulose (Holt og Håstein 1970). Symptomene ble beskrevet som en betennelse i tarmen og anal inversjon.

Atypiske isolater finnes oftest hos ikke-salmonider (Austin og Austin 1987), men de finnes også hos salmonider og kan være svært patogene der (Paterson 1983, Whittington og Cullis 1988). Sykdommer som er forårsaket av atypiske *A. salmonicida* er ulcer disease (byllesyke), som er en vidt utbredt sykdom hos laksefisk i USA. Den er også beskrevet fra atlantisk laks i USA (Paterson 1983). Whittington og Cullis (1988) fant at en atypisk strain av *A. salmonicida* isolert fra gullfisk i Australia var svært virulent hos salmonider, og de kliniske symptomene var lik de hos klassisk furunkulose. Carp erythrodermatitis (CE) er en del av "carp dropsy syndrome" som er godt kjent fra oppdrett av karpe, og denne sykdommen er også fremkalt av atypiske strains av *A. salmonicida* (Whittington et al. 1987). Håstein et al. (1978) beskrev en sykdom hos ørekyte her i Norge som gav massedødelighet. Sykdommen var forårsaket av *A. s. achromogenes*. Wichardt et al. (1989) skilte mellom pigmentproduserende atypiske strains av *A. salmonicida* og ikke-pigmentproduserende atypiske strains av *A. salmonicida*. De fant at atypiske *A. salmonicida* i hovedsak angrep ørret og røye, mens de typisk *A. salmonicida* angrep laks.

Det er isolert atypiske *A. salmonicida* fra en lang rekke fiskearter, og nye fiskearter kommer fortsatt til listen. Atypiske former er isolert fra abbor, gjedde, mort og flire (*Blicca bjoerkna*) (McCarthy 1975), og fra laks, ørret, regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), røye, bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*), canadarøye (*Salvelinus namaycush*) og harr (*Thymallus thymallus*) (Wichardt et al. 1989). Whittington et al. (1987) beskrev en atypisk *A. salmonicida* fra gullfisk i blandet kultur med *Aeromonas hydrophila* som er en motil aeromonad. Ifølge McCarthy (1977) er atypiske *A. salmonicida* sannsynligvis mere vanlig enn hva antall publikasjoner i den internasjonale litteraturen tilsier.

Ut fra beskrivelser over sykdomsforløpet til atypiske strains ser dette ut til å ha mange likheter med sykdomsforløpet til klassisk furunkulose slik det er beskrevet fra laks (Whittington og Cullis 1988). Det ser derfor ut til å være glidende overganger mellom de ulike former av *A. salmonicida* med hensyn på hvilken sykdom som fremkalles, og det har vært stilt spørsmålsteget ved den generelle oppfatningen av at furunkulose er fremkalt kun av ett patogen nemlig *A. s. salmonicida*. Det er kanskje på tide å inkludere de atypiske formene når man snakker om sykdommen furunkulose (Paterson 1983). Dette gjelder kanskje særlig for infeksjon av vill-fisk, hvor det kan være mange patogener som sammen gir sykdom. Det kan være verdt å merke seg at atypiske *A. salmonicida* har vært påvist regelmessig i oppdrettsanlegg og elver i Norge i perioden 1968 til 1988. Den er rapportert fra regnbueørret, sjøørret, innlandsørret, laks, røye, stingsild (*Gasterosteus aculeatus*), karpe og laue (*Alburnus alburnus*) (Håstein 1989).

Bakterien overføres antakeligvis fra syk fisk til frisk fisk gjennom vannet, og invasionsruter i fisken er antatt å være gjellene og muligens mage-tarm kanalen. Forsøk har vist at fisken blir infisert hvis den har sår på huden og kommer i kontakt med patogenet (Cipriano 1982). Forsøk har vist at 8 timer etter injeksjon av bakterien i fisk var det mulig å påvise patogenet i nyre-utstryk (Klontz et al. 1966).

I den senere tid har det vært fremsatt en teori om hudparasitten lakselus (*Lepeoptheirus salmonis*) kan overføre bakterien mellom fisk i sjøen (Nylund pers.medd.), men det gjenstår å bevise dette. At patogener overføres med hudlevende parasitter er imidlertid godt kjent fra bl.a. trypanosomer (blodlevende parasitt) hos fisk som overføres med fiskeigler. McCarthy og Roberts (1980) fant at lateral transmisjon av bakterien var lite sannsynlig fordi den ikke overlevde på øye-rogn, mens Lange og Ljungberg (1962) antydte at *A. s. salmonicida* var blitt introdusert til Sverige ved infisert øyerogn.

1.4 Påvisning av *A. s. salmonicida*

Ved klassisk furunkulose som er forårsaket av "typiske" former av *A. s. salmonicida*, kan patogenet lett påvises i syk fisk, særlig fra sår og nyrer ved bruk av et standard, ikke-selektivt agar-medium. Tryptone soya agar (TSA) er den mest brukte. På TSA vil *A. s. salmonicida* gi kolonier med et typisk brunt pigment etter inkubering ved 20-25°C i 3-4 dager (Austin og Austin 1987). Ved å tilsette et blått fargestoff, Comassie Brilliant Blue, vil koloniene med *A. s. salmonicida* fremtre med en blå ring rundt som gir sikrere avlesning av agar-platene (Markwardt et al. 1989). Andre agar-media som også har vært anbefalt

er "brain-heart-infusion agar" (BHIA), eller agar som er anrikt med blod. Daly og Stevenson (1985) viste at det er viktig å dyrke utstryk fra mer enn ett organ for hver fisk som undersøkes, fordi dette øker sjansen for å påvise bakterien.

I tillegg til vanlige dyrkningsmetoder er det blitt utviklet andre og raskere tester for å påvise patogenet med henblikk på diagnose og rask behandling (i oppdretts-situasjon). En slik metode er latex-agglutinerings test (McCarthy 1975), som går ut på at små latex-partikler blir dekket (coated) med spesifikt globulin. Såsant denne metoden kan påvise *A. s. salmonicida* fra fiskevev tar prosedyren omlag 2 timer. En fordel med denne metoden er at den kan benyttes i tilfeller der vanlig dyrking ikke kan gjennomføres, f.eks. når fisken har vært frosset ved -20°C i 14 dager, eller fra formalin-fiksert materiale (McCarthy 1975). En annen rask metode er India-ink-immunostaining reaksjon (Geck 1971, McCarthy og Whitehead 1977) hvor vevsutstryk blir tilsatt India ink (blå-farget) og spesifikt antistoff, og hvor preparatene undersøkes under mikroskop etterpå. Preparatene er klare til avlesning etter 15 minutter.

Kimura og Yoshimizu (1983,1984) utviklet en co-agglutineringssteknikk, som benytter anti-*A. salmonicida* - antistoff følsomme stafylokokker i suspensjon. Denne testen gir resultater i løpet av 30-60 min., og er svært pålitelig (Austin og Austin 1987). Denne teknikken er også antatt å være velegnet i felt-situasjoner.

Smith (1981) undersøkte hvorvidt ELISA-teknikken (=enzym-linked immunosorbent assay) kunne benyttes til en rask påvisning av furunkulose, og fant at teknikken kunne påvise bakterier i tettheter ned til 100 bakterier pr.ml. Han antydte at teknikken sannsynligvis ville egne seg til påvisning av bærere. Adams og Thompson (1990) utviklet en lang og en kort ELISA-test for å påvise furunkulose. I den korte ELISA-testen ble cellene dekket med anti-*A. salmonicida* antiserum og deretter tilsatt fiskevev. Inkuberingstiden var fra 15 til 30 minutter, og etter endt test ble cellene blå-farget og kunne avleses uten ELISA-reader. Den lange ELISA-testen var identisk med den korte bortsett fra at inkuberingstiden ble forlenget fra 90 minutter til 3 timer. Her ble cellene gul-farget og måtte avleses i en ELISA-reader. Den korte ELISA-teknikken var mindre følsom enn den lange, men forfatterne hevdet at den vil være nyttig når celle-tallet er forventet å overstige 1×10^6 celler/ml. Falske negative kan forekomme, og metoden egner seg best for kvalitative undersøkelser. Den lange ELISA-testen er velegnet for sub-kliniske tilfeller av furunkulose, og er følsom helt ned til 1000 celler/ml og kan også benyttes i en mer kvantitativ analyse, fordi det ikke var antydning til falske positive reaksjoner (Adams og Thompson 1990).

En "indirect fluorescent antibody technique" (IFAT) ble første gang beskrevet for påvisning av furunkulose av Klontz og Anderson (1968). Teknikken går ut på at vevsavtrykk på et objektglass blir tilsatt monoklonalt antistoff som retter seg mot spesifikke overflateantigener på bakterien. Teknikken er enkel og spesifikk og tar kort tid (2 timer), men preparatene må avleses i et fluorescens mikroskop.

Sakai et al. (1986) sammenlignet latex-agglutinerings-, co-agglutinerings-, IFAT og to ELISA-teknikker og fant at IFAT og ELISA var de mest følsomme testene. IFAT kunne påvise bakterie-konsentrasjoner ned til 10 000 bakterier/ml, mens ELISA kunne påvise bakterier ned mellom 100 og 1000 bakterier/ml.

Påvisning av bærere av *A. s. salmonicida* er av stor betydning for undersøkelser angående transmisjonen av bakterien. Men undersøkelser og påvisning av bærere har vært forhindret av at teknikkene ikke har vært følsomme nok til å fange opp små konsentrasjoner av bakterien. Bullock og Stuckey (1975) utviklet en LCT-test (latent carrier test), hvor fisken fikk en corticosteroid injeksjon og deretter ble temperatur-stresset. Denne stressingen skal da utløse en latent infeksjon. Etter endt forsøk ble utstryk av nyrene dyrket på blod-agar, og resultatene viste at 73% av fisken døde, og av disse var 33% infisert med *A. s. salmonicida*.

Det har vært vist at bakterien kan overleve i vann fra noen timer opptil flere dager, og det er også påvist at *A. s. salmonicida* kan finnes i bunnslam og på utstyr i oppdrettsanlegg (McCarthy 1977). Likevel har det vist seg svært vanskelig å påvise *A. s. salmonicida* i vann i forbindelse med utbrudd av furunkulose på det tidspunkt man kunne forvente høye tettheter av bakterien fritt i vannet (Cornick et al. 1969, Kimura 1970, Allen 1982). Grunnene til dette kan være mange, men særlig har det vært lagt vekt på at kolonier av *A. s. salmonicida* raskt blir inhibert og overgrodd av andre bakterier (Austin og Austin 1987).

Det har vist seg at det er svært stor homogenitet i isolater av *A. s. salmonicida*. Biokjemiske og serologiske reaksjoner er svært like (Paterson et al. 1980, Austin og Austin 1987), og det samme gjelder plasmid-profilene (Bast et al. 1988). Typing av bakteriofager (virus) har vist seg å være en metode for å skille ulike isolater av *A. s. salmonicida* (Popoff og Lallier 1984, Popoff 1984), men dette er en tidkrevende prosess som bare kan utføres av spesiallaboratorier (McCormick et al. 1990). Fingerprinting-teknikk (restriction endonuclease fingerprinting) har vist seg å være en teknikk hvor ulike kategorier av typiske isolater av *A. s. salmonicida* kan påvises (McCormick et al. 1990).

2. *A. s. salmonicida*; spredning og geografisk utbredelse

2.1 En historisk oversikt over kjente forekomster av furunkulose og *A. s. salmonicida*

Bakterien ble første gang beskrevet av Emmerich og Weibel (1894) i Tyskland, fra oppdrett av ørret, og har idag en verdensomspennende utbredelse (Figur 1) som korresponderer med utbredelsen av laksefisk og andre egnede verter (Austin og Austin 1987). Bakterien ble første gang påvist i ville bestander av laksefisk av Plehn (1909, 1911) som påviste den på ørret i 25 elver i Bavaria. Etter disse første grunnleggende studier ble den påvist tidlig dette århundret i Østerrike, Belgia, Frankrike, Irland, Storbritannia og Sveits (Austin og Austin 1987). I Storbritannia ble sannsynligvis furunkulose første gang observert i 1909. I 1911 var det utbrudd av furunkulose i flere elver i sørvest-England (Masterman og Arkwright 1911). Etter dette spredte bakterien seg fra sørvest-England både nordover og vestover på de Britiske øyer. I 1927 ble furunkulose påvist i Wales og i 1926 i de første skotske elver. I 1929 ble bakterien påvist i Aberdeen Dee (Mackie et al. 1930, 1933, 1935). I Irland ble furunkulose første gang påvist i 1913 (Mettam 1914), og spredte seg utover i mer begrenset omfang enn i Storbritannia.

I Nord-Amerika ble første påvisning gjort av Marsh (1902) fra et klekkeri/oppdrettsanlegg i Michigan, i 1927 forårsaket den stor dødelighet i et oppdrettsanlegg i Massachusetts. Men sykdommen fantes ikke bare i oppdrettsanlegg, Fish (1937) påviste bakterien i ørret (*Salmo trutta*) fra en innsjø i Wyoming. I Canada ble bakterien påvist i *Prosopium williamsoni* (Rocky Mountain whitefish), *Salvelinus malma* (Dolly varden) og *Salmo clarkii* (cutthroat trout). Men på tross av flere rapporter om utbrudd av furunkulose i Nord-Amerika ser det ikke ut til at bakterien der forårsaket store epidemier (Austin og Austin 1987).

I Sverige ble furunkulose første gang påvist i 1951 i oppdrettsanlegg langs fire hovedvassdrag: Dalelven, Indalselven, Ångerman elv og Lule elv (Lange og Ljungberg 1962, Wichardt et al. 1989). Bakterien er også påvist i Danmark hvor den er vidt utbredt i damoppdrett av regnbueørret (Christensen et al. 1963). Ojala (1963) rapporterte at bakterien sannsynligvis fantes i Finland, men utbrudd av furunkulose ble ikke diagnostisert før 1986 hvor det ble rapportert flere utbrudd samtidig (Bylund 1989).

Furunkulose ble første gang påvist i Norge på regnbueørret i et oppdrettsanlegg i Vestfold i 1964 etter import av fisk fra Danmark (Lunder og Håstein 1990). I en periode etter dette ble sykdommen funnet i flere anlegg, men det siste infiserte anlegget ble sanert i 1969 (Håstein 1989). Furunkulose ble også påvist på laks i Numedalslågen i 1966 og ble påvist der frem til 1979. Utbruddet førte ikke til noen kjent spredning av bakterien (Holt og Håstein 1970, Håstein 1990). Neste utbrudd av furunkulose ble rapportert i 1985 på oppdrettslaks i Nord-Trøndelag (Namsos). Fra dette oppdrettsanlegget har furunkulosen spredt seg nordover og sørover mellom oppdrettsanlegg og til vassdrag. Det første tilfellet på vill-laks er antatt å være i 1987 fra elva Eira i Møre og Romsdal (Johnsen et al. 1993).

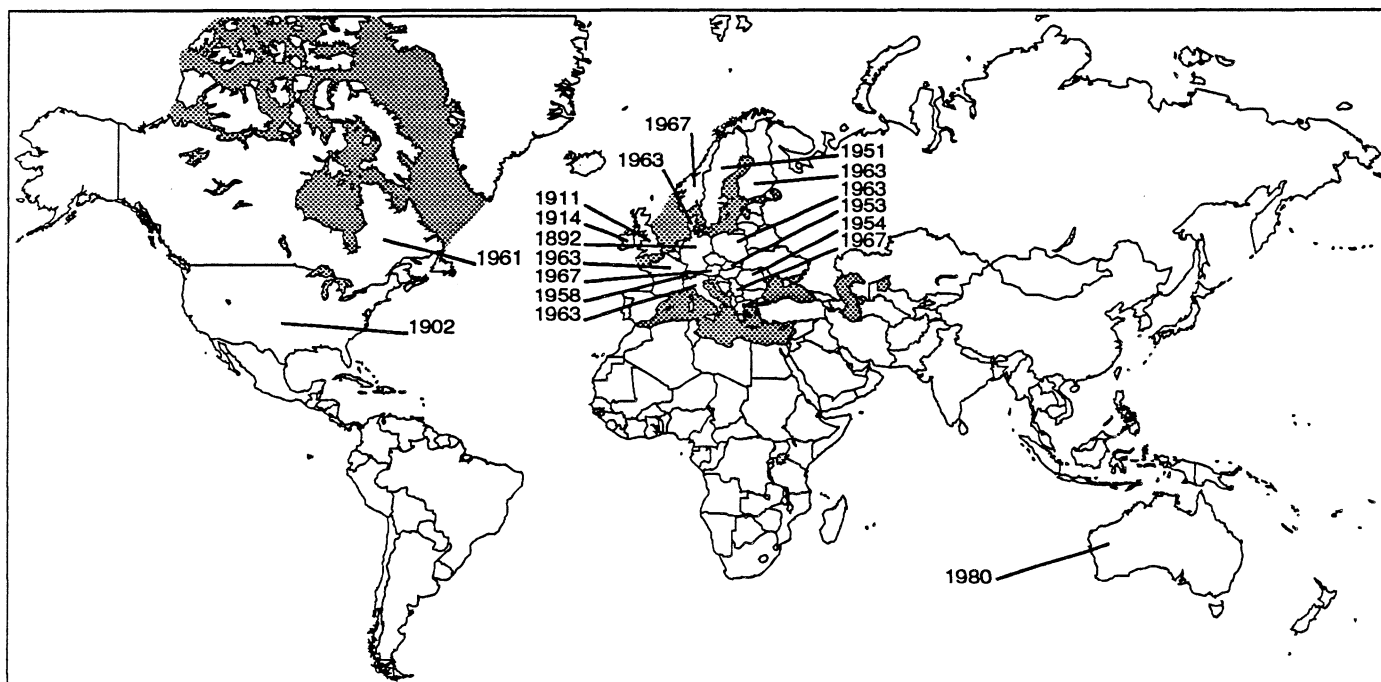
2.2 Spredningsmekanismene til *A. s. salmonicida*.

Den viktigste måten for innføring av bakterien til et nytt område er antatt å være med innførsel av fisk som er infisert uten å vise kliniske symptomer (Mackie et al. 1930, 1933, 1935, McCarthy 1980, Whittington et al. 1987, Wichardt et al. 1989). Paterson (1983) indikerte at bakterien kunne være av

Nord-Amerikansk opprinnelse fordi regnbueørret var forholdsvis mere resistent til bakterien enn alle de andre artene av salmonider. Austin og Austin (1987) hevdet derimot at bakterien hadde opphav i ørretoppdrett i sentral-Europa, og har derfra spredt seg utover til de fleste land i Europa og til Nord-Amerika. Mackie et al. (1930) konkluderte sine studier i England med at *A. s. salmonicida* var blitt introdusert med infisert ørret fra Europa (Danmark?). Spredning mellom vassdrag ble også satt i sammenheng med forflytning av fisk. Smith (1962) diskuterte imidlertid muligheten for at *A. s. salmonicida* hadde vært tilstede i England over en lengre periode enn antatt av Mackie et al. (1930), uten at dette kunne bevises i ettertid.

Lange og Ljungberg (1962) indikerte at utbrudd av furunkulose i svenske kultiveringsanlegg var et resultat av import av infisert øyerogn fra Danmark, men de kunne ikke utelukke muligheten for av *A. s. salmonicida* hadde vært tilstede fra før.

Når det gjelder forekomsten av bakterien i Norge er det beskrevet to introduksjoner (Lunder og Håstein 1990). Den første introduksjonen var på slutten av 60-tallet med regnbueørret til et oppdrettsanlegg i Numedalslågen. Den andre introduksjonen var i 1985, hvor infisert laksesmolt ble importert til et marint oppdrett i Nord-Trøndelag fra Skottland (Lunder og Håstein 1990).



Figur 1: Dagens utbredelse av fiskesykdommen furunkulose som er fremkalt av bakterien *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. - The known distribution of the fish disease furunculosis caused by the bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

3. Spredningsforløpet til *A. s. salmonicida* i Storbritannia, Sverige og Norge.

3.1 Furunkulose i lakse-vassdrag i Storbritannia.

På grunnlag av opplysninger i rapportene fra The Furunculosis Committee (Mackie et al. 1930, 1933, 1935) har vi tegnet inn på kart (Figur 2-7) den kronologiske registreringen av nye lokaliteter med furunkulose i britiske laksevassdrag i perioder fra 1911 til 1934. Disse registreringene oppfattes først og fremst som løpende fra syd til nord over disse årene, og spredningen av *A. s. salmonicida* i Storbritannia er vanligvis beskrevet som en retningsbestemt syd-nord prosess. De geografiske betingelser gitt ved introduksjonslokalitetens beliggenhet helt i syd og øyas utstrekning i nord-syd retning gir dette som et nødvendig resultat. Det er derfor verdt å merke seg at det i alle perioder fra 1918 og utover også registreres nye lokaliteter i hele det arealet som ligger bak fronten mot nord. En ensidig vekt på de lokalitetene som til enhver tid ligger lengst mot nord resulterer derfor i en svært forenklet beskrivelse av spredningen.

Et annet forhold som kan observeres fra kartene er at spredningsraten varierer mye i perioder. På de 14 årene fra 1911 til 1925 har spredningen dekket en distanse av størrelsesorden 200 km til omkring 6 lokaliteter. I løpet av de 3 årene fra 1926 til 1928 dekker spredningen plutselig en distanse av størrelsesorden 600 km til omkring 20 lokaliteter. I perioden 1929 -1932 ble det også rapportert omkring 15 nye lokaliteter hvorav omkring 10 var i nord-øst Skottland. I den siste perioden som dekkes av rapportene som disse dataene er hentet fra, fra 1933 til 1934, er det omkring 10 nye lokaliteter fordelt i hovedsak i nord-øst Skottland og syd England/Wales.

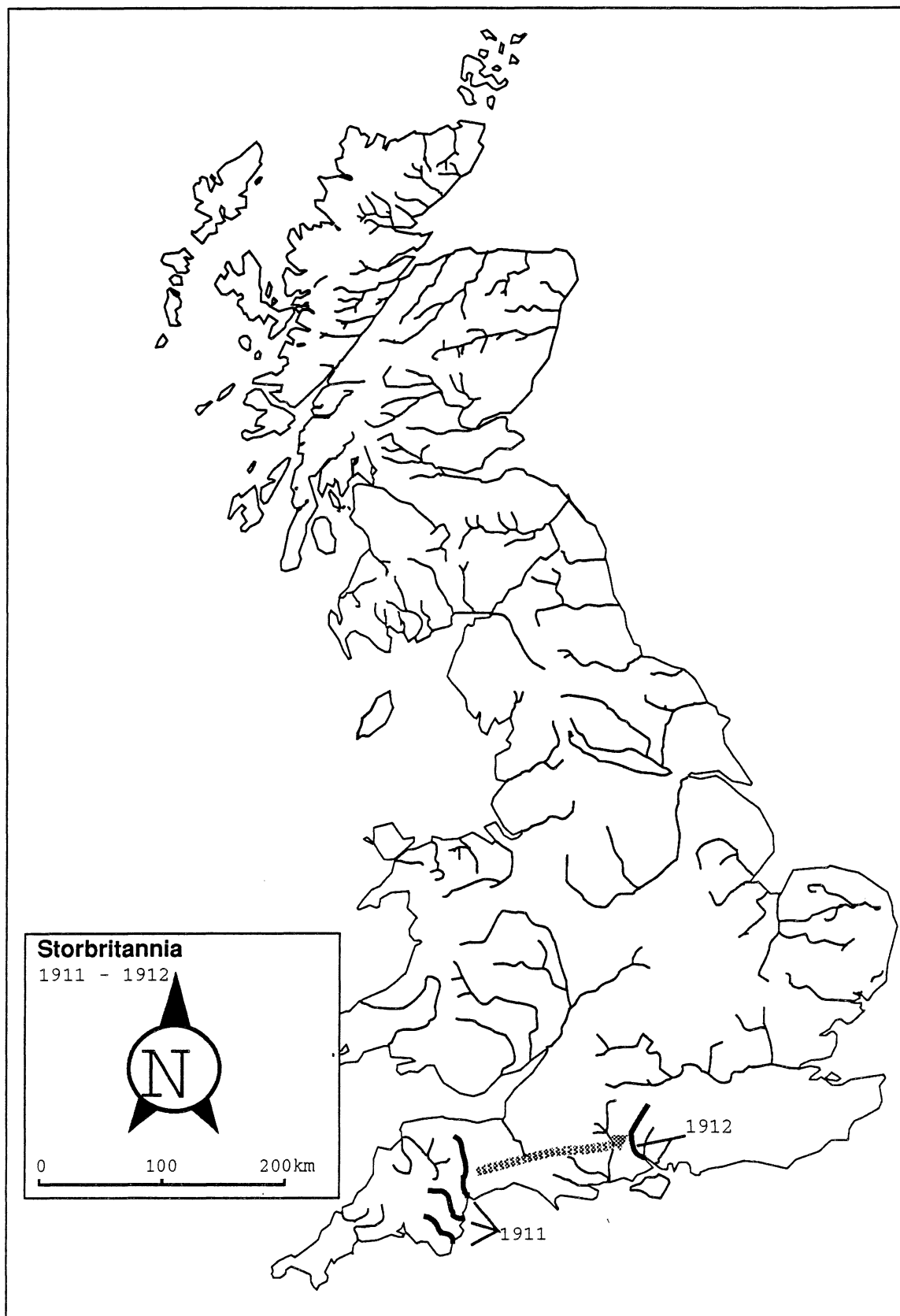
3.2 Furunkulose i svenske kultiveringsanlegg

Figurene 8-11 over utbredelsen av furunkulose i svenske oppdrettsanlegg er bygget på Wichardt et al.

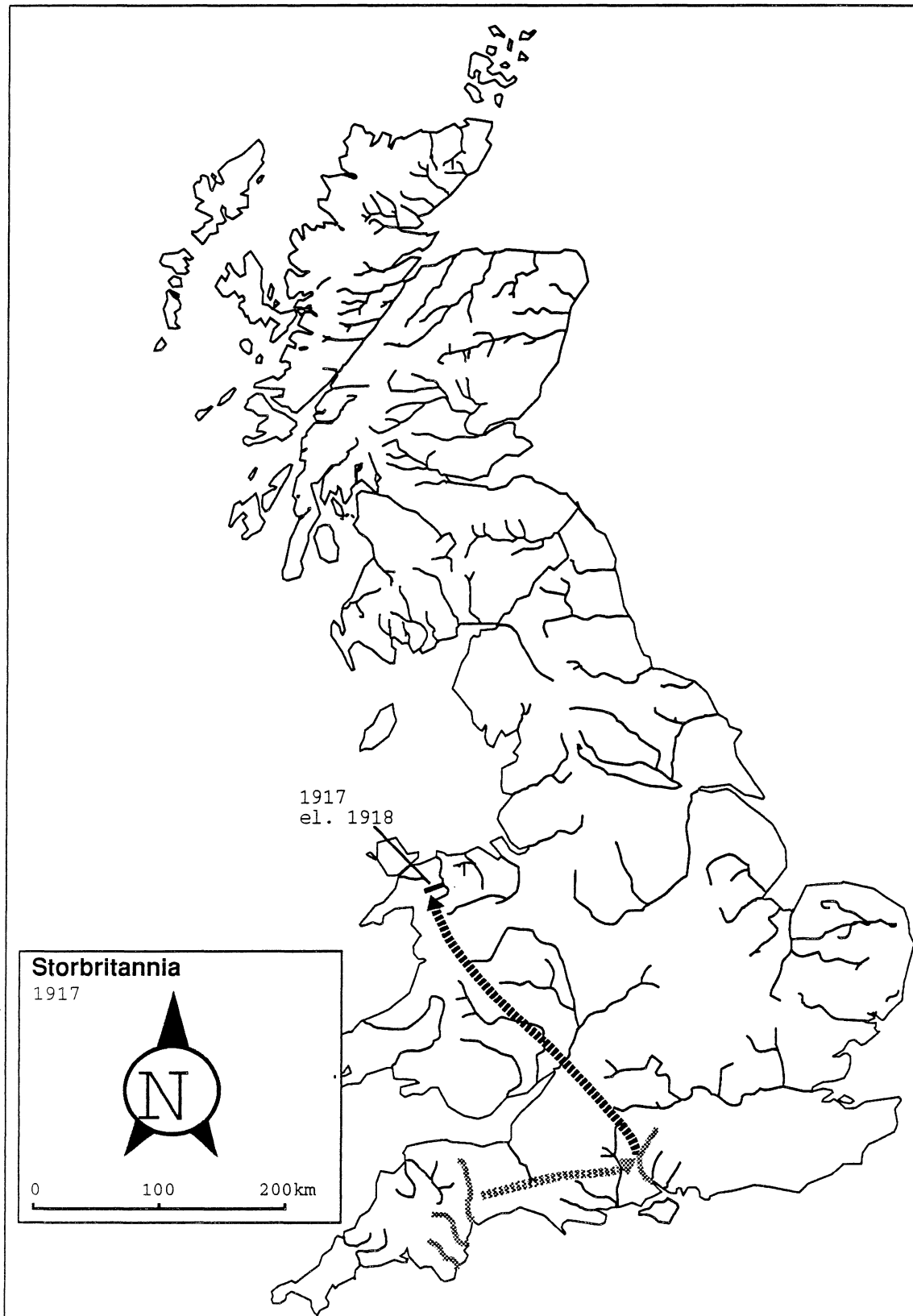
(1989). *A. s. salmonicida* er antatt å ha blitt introdusert til svenske oppdrettsanlegg fra Danmark i 1951 med infisert fisk (Lange og Ljungberg 1962). Spredningen til nye anlegg har foregått ved flytting av infisert fisk, og muligens i noen tilfeller ved utslipp av vann fra et infisert anlegg (Wichardt et al. 1989). Det synes å fremgå av Figur 8 at i perioden fra introduksjonen til vest i midt-Sverige i 1951 har *A. s. salmonicida* frem til 1959 i hovedsak blitt spredt til anlegg innenfor en avstand av omkring 300 km øst og sør for introduksjonstedet, men i tillegg er bakterien også spredt til et anlegg omkring 600 km nord for dette. I de 18 årene fra 1959 til 1977 skjer det en spredning til 8 nye anlegg som alle er innenfor en avstand av maksimum 300 km fra anlegg som allerede er smittet. Dette mønsteret forsterkes i perioden 1980-1986 hvor utbredelsen av *A. s. salmonicida* når 10 nye anlegg slik at forekomsten dekker hele Sverige.

3.3 Furunkulose i norske oppdrettsanlegg og vassdrag

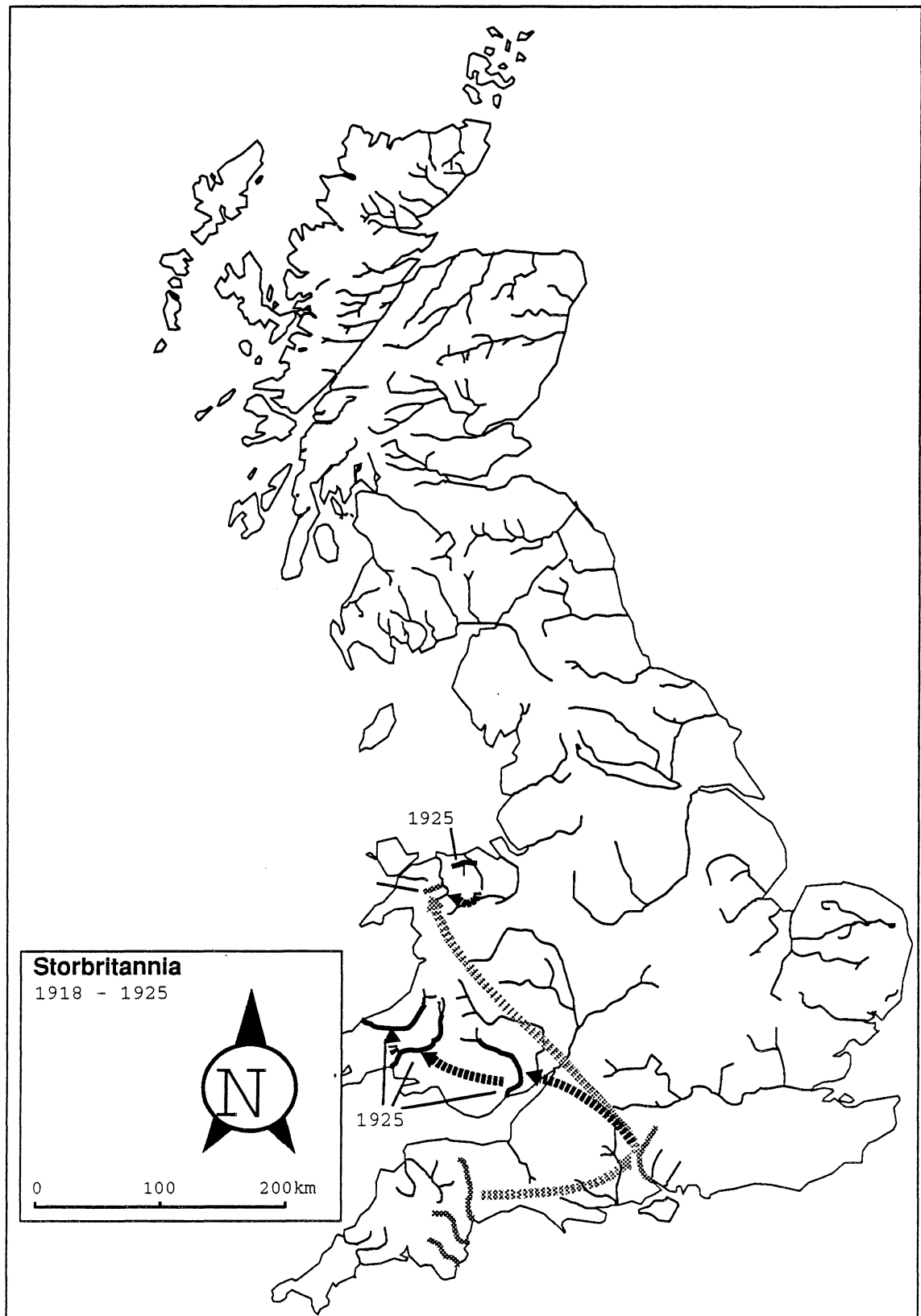
Johnsen et al. (1993) har laget en oversikt over forekomsten av furunkulose i norske vassdrag og oppdrettsanlegg etter at sykdommen ble påvist i et oppdrettsanlegg i sjøen i Nord-Trøndelag i 1985 etter import av laksesmolt fra Skottland. Etter dette har sykdommen frem til 1992 spredd seg til anlegg i Troms i nord og til Vest-Agder i sør. Den første påvisning av furunkulose i vassdrag etter 1985 er noe usikker, men i 1989 ble den påvist i 20 vassdrag fra Nord-Trøndelag til Sogn og Fjordane. I 1990 kom 20 nye vassdrag til, og nordgrensen flyttet seg til Nordland og sørgrensen til Hordaland, og i 1991 ble furunkulose påvist i 24 nye vassdrag med sørgrense i Rogaland. I 1992 kom 7 nye vassdrag innenfor det etablerte utbredelsesområdet langs kysten i tillegg til et vassdrag i innlandet (Randselva i Buskerud) (Johnsen et al. 1993). Disse opplysningene gir det inntrykk at senteret for spredning til eller mellom vassdrag er i Møre og Romsdal og ikke i Nord-Trøndelag hvor sykdommen først ble påvist i oppdrettsanlegg i denne perioden. Tilsvarende de britiske resultatene kan man oppfatte en front som beveger seg, men her kan den bevege seg både nordover, sørover og østover, noe den også gjør. I tillegg kan man her også oppfatte en kontinuerlig og komplisert spredningsdynamikk i det arealet som til enhver tid ligger innenfor fronten. Også i spredningsprosessen i Norge synes *A. s. salmonicida* å oppnå en "skritt lengde" på opptil omkring 300 km eller mer.



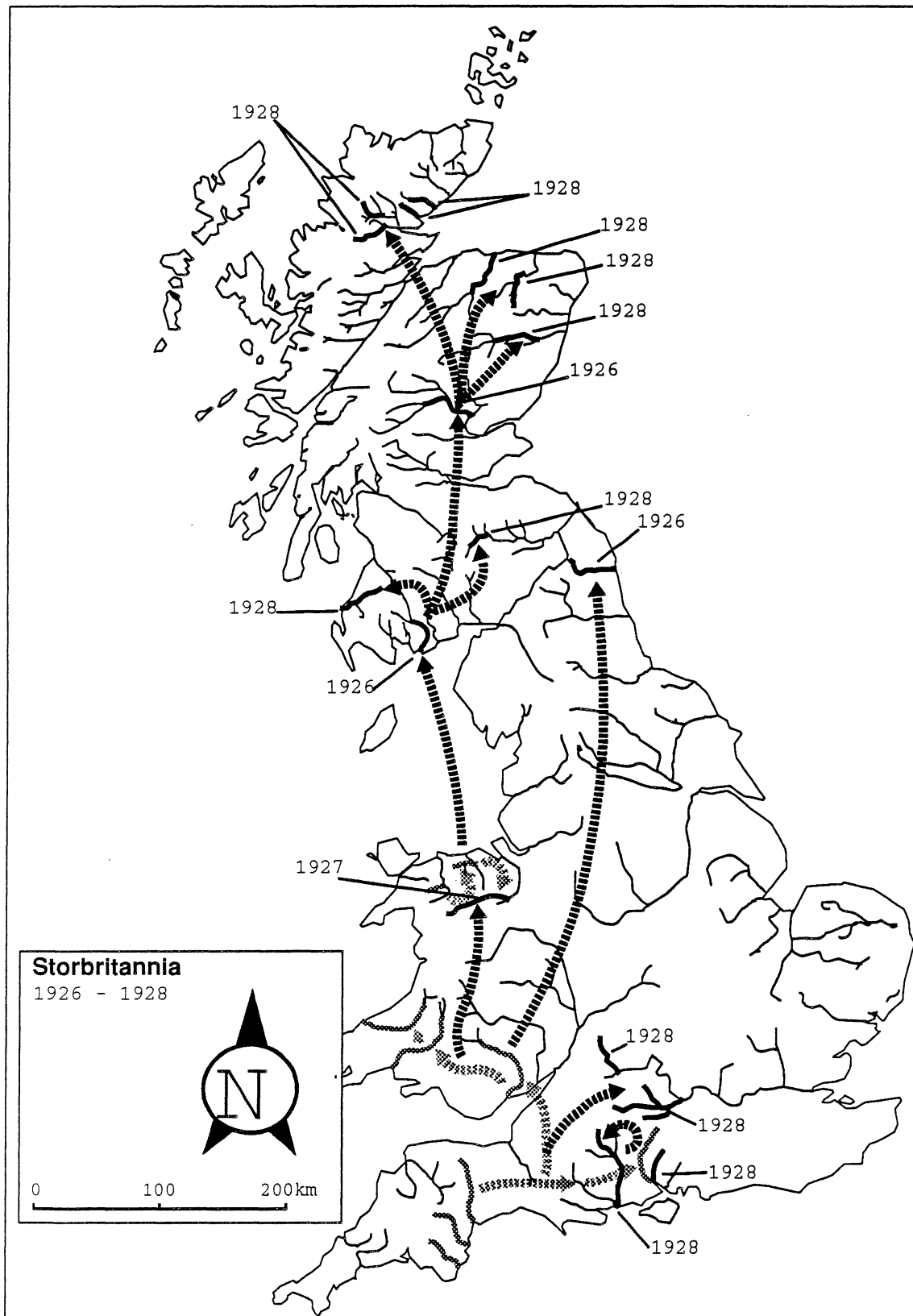
Figur 2. Introduksjonspunkt og utbredelse til furunkulose i vassdrag med laksefisk i Storbritannia 1911-1912. (Tegnet etter Mackie et al. 1930.) - Point of introduction, and subsequent distribution of furunculosis in salmonid rivers in Great Britain 1911-1912. (Redrawn after Mackie et al. 1930.)



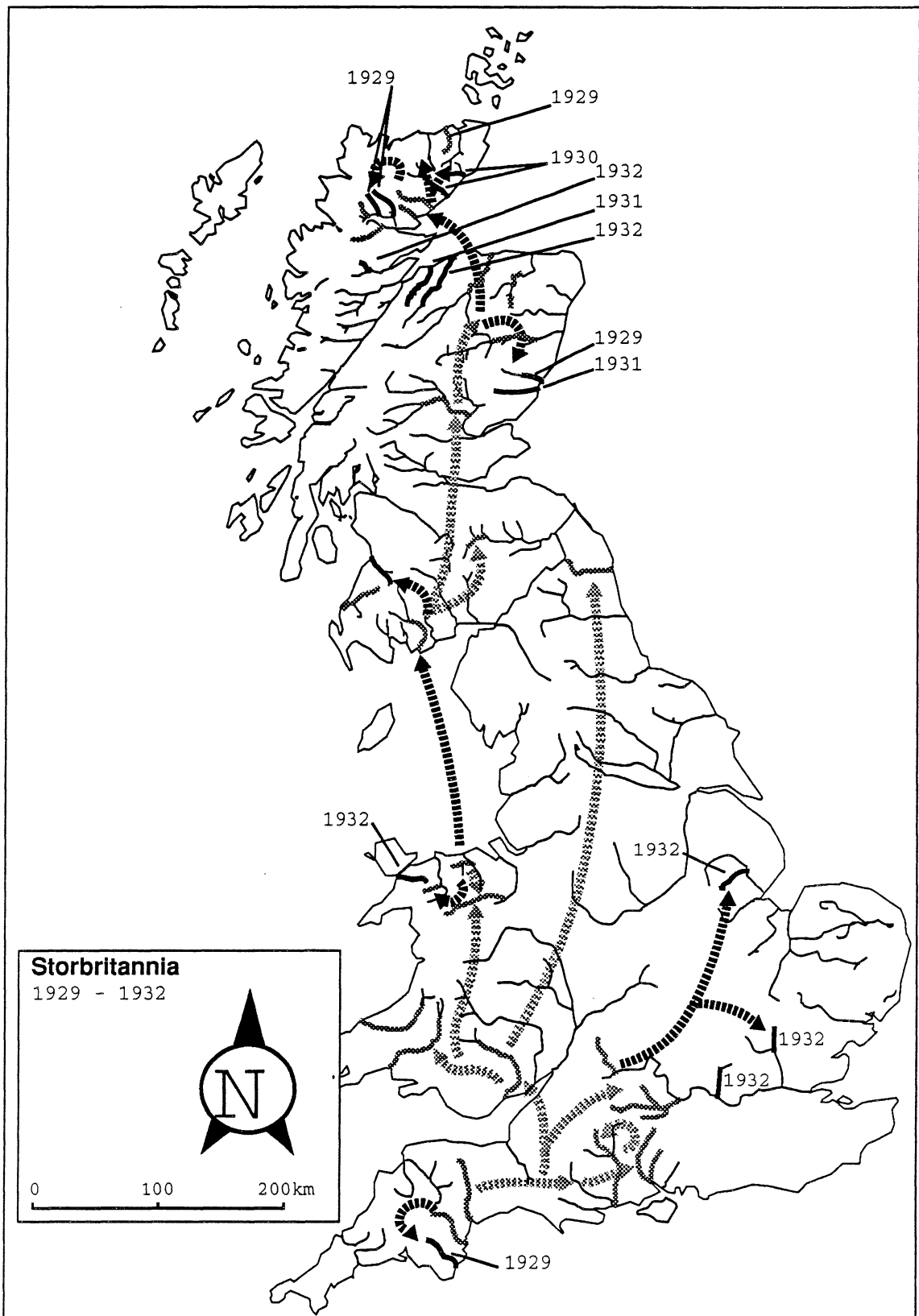
Figur 3. Utbredelse til furunkulose i vassdrag med laksefisk i Storbritannia 1917. (Tegnet etter Mackie et al. 1930.) - Distribution of furunculosis in salmonid rivers in Great Britain 1917. (Redrawn after Mackie et al. 1930.)



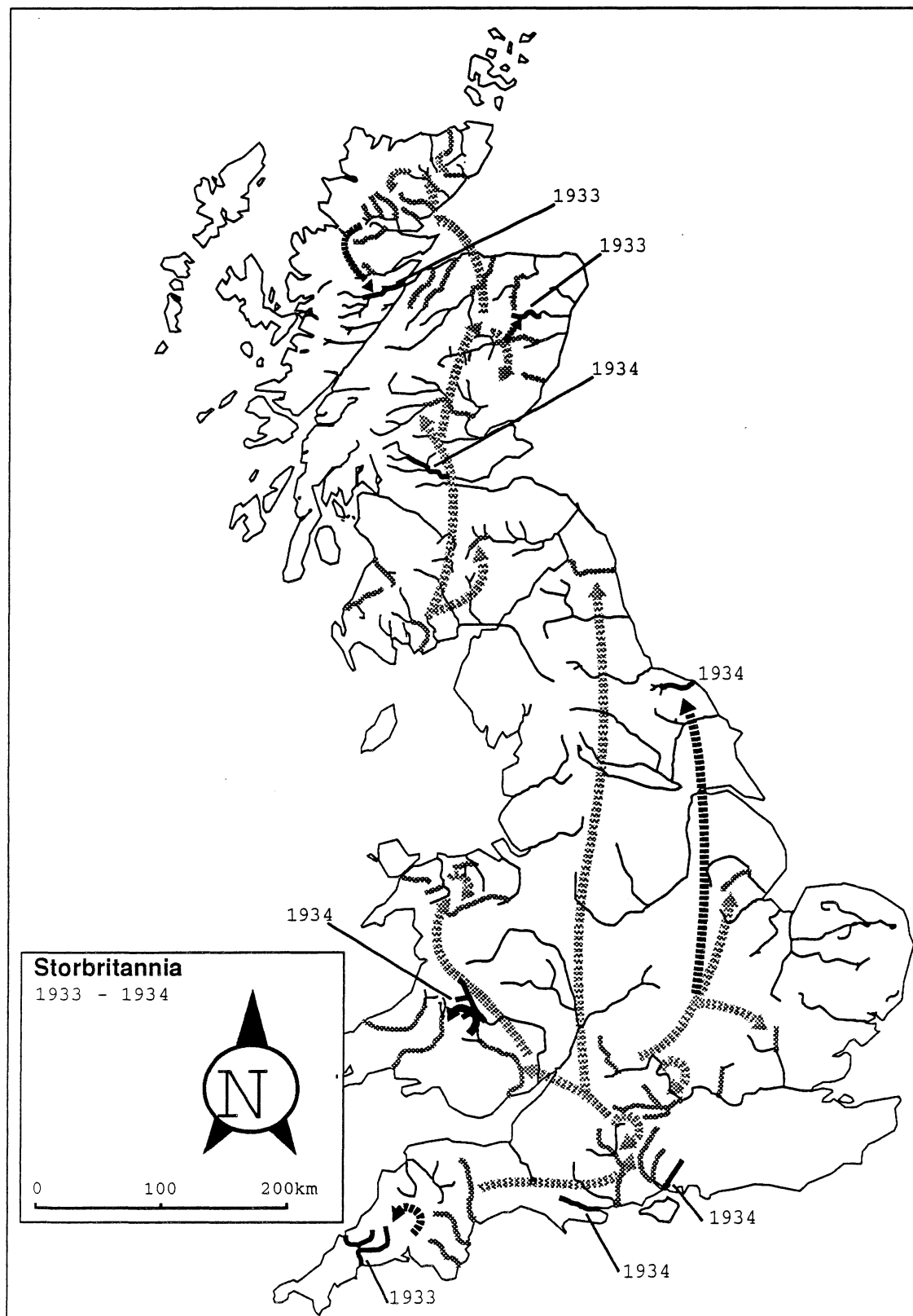
Figur 4. Utbredelse til furunkulose i vassdrag med laksefisk i Storbritannia 1925. (Tegnet etter Mackie et al. 1930.) - Distribution of furunculosis in salmonid rivers in Great Britain 1925. (Redrawn after Mackie et al. 1930.)



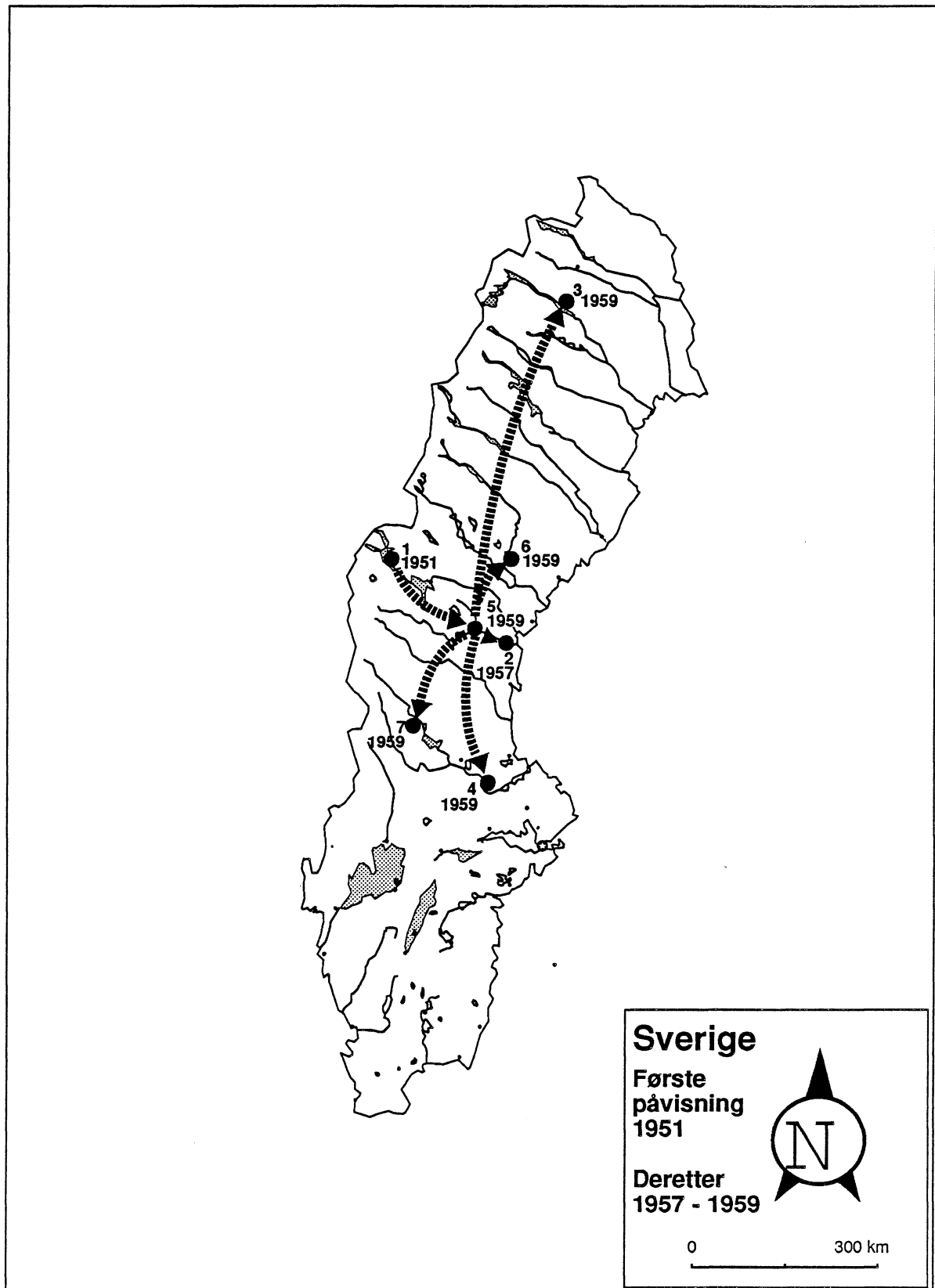
Figur 5. Utbredelse til furunkulose i vassdrag med laksefisk i Storbritannia 1926-1928.
 (Tegnet etter Mackie et al. 1930, 1933.) - Distribution of furunculosis in salmonid rivers in
 Great Britain 1926-1928. (Redrawn after Mackie et al. 1930, 1933.)



Figur 6. Utbredelse til furunkulose i vassdrag med laksefisk i Storbritannia 1929-1932. (Tegnet etter Mackie et al. 1933, 1935.) - Distribution of furunculosis in salmonid rivers in Great Britain 1929-1932. (Redrawn after Mackie et al. 1933, 1935.)



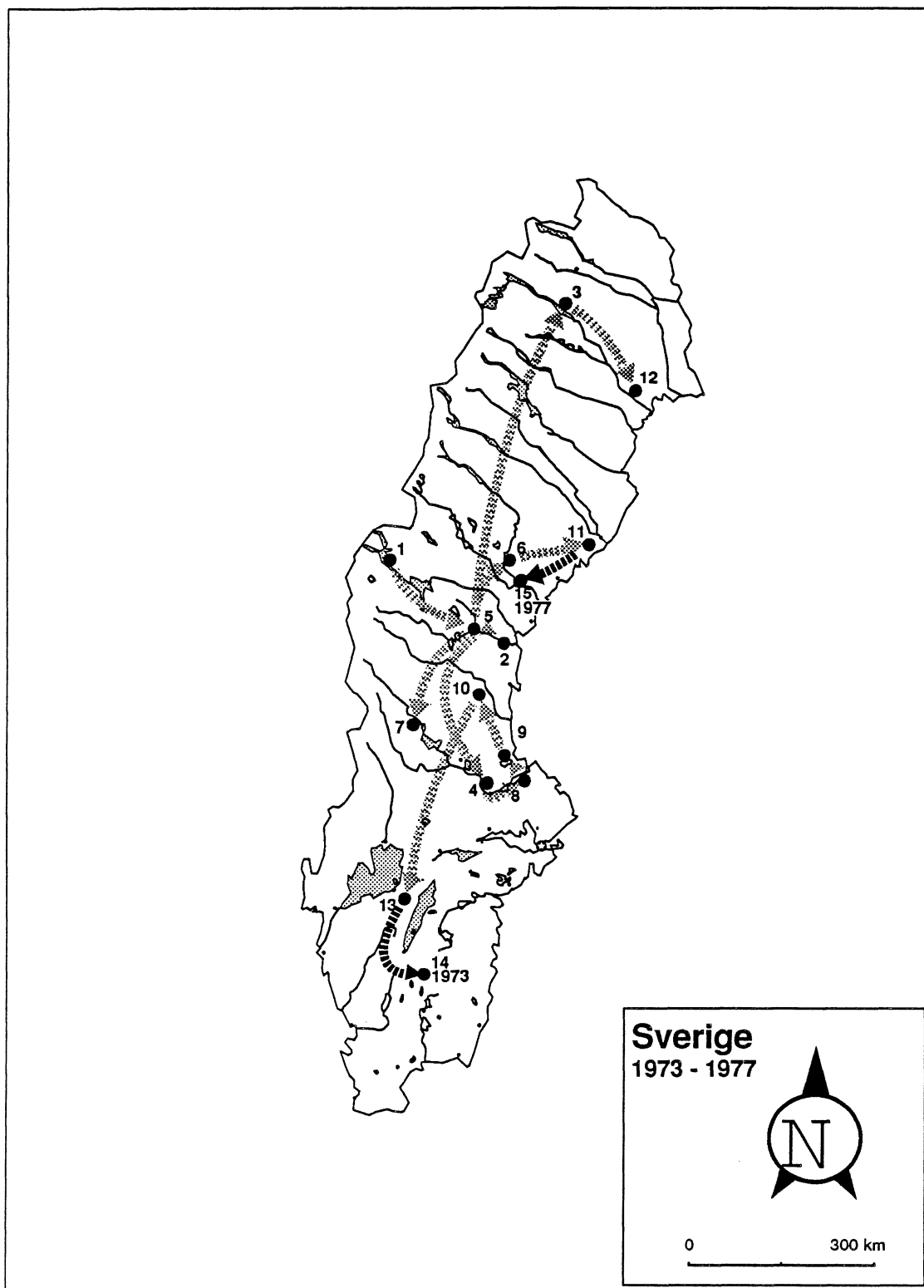
Figur 7. Utbredelse til furunkulose i vassdrag med laksefisk i Storbritannia 1933-1934. (Tegnet etter Mackie et al. 1935.) - Distribution of furunculosis in salmonid rivers in Great Britain 1933-1934. (Redrawn after Mackie et al. 1935.)



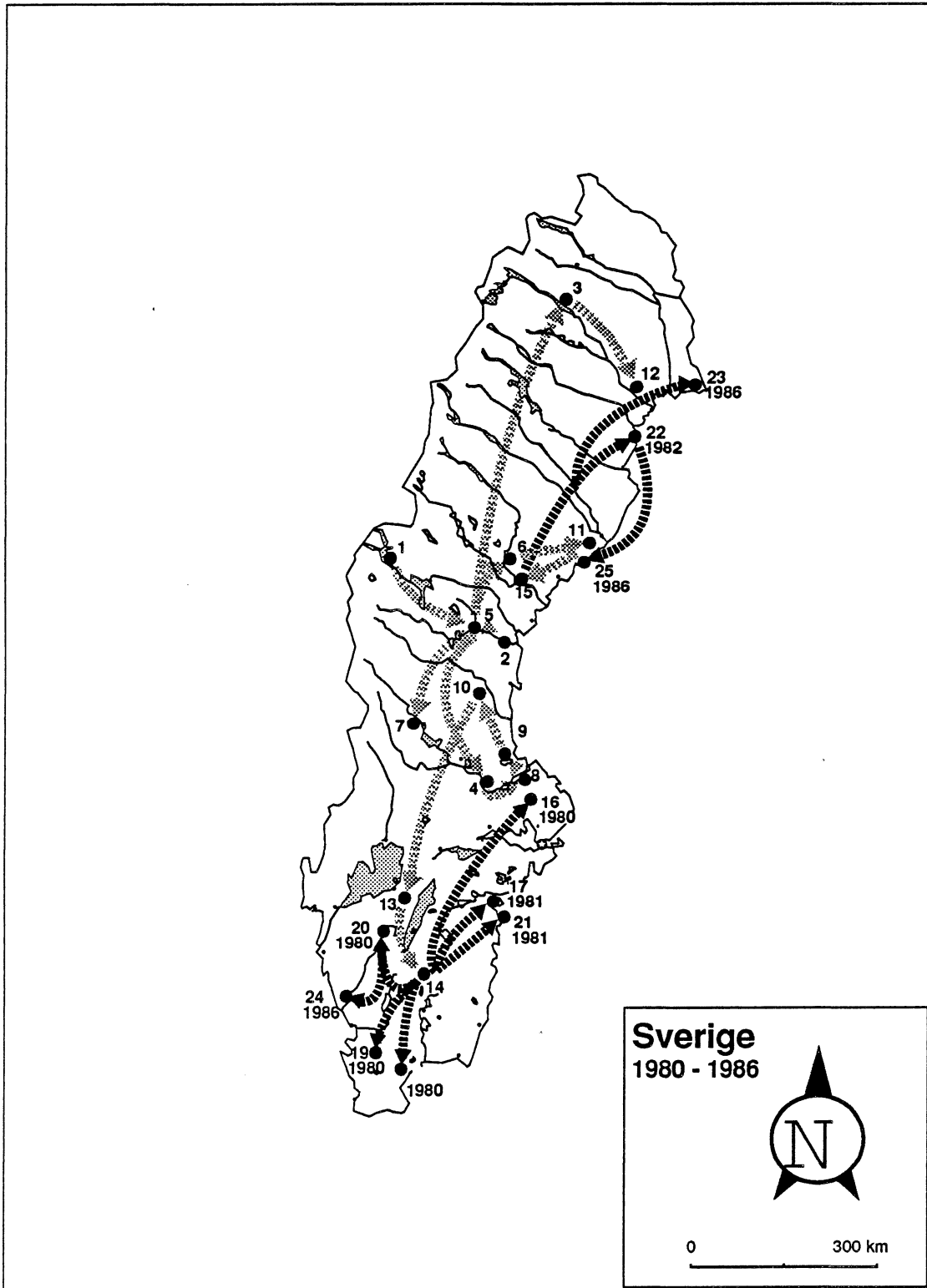
Figur 8. Utbredelse til furunkulose i svenske oppdrettsanlegg 1951-1959. (Tegnet etter Wichardt et al. 1989.) - Distribution of furunculosis in Swedish fish farms 1951-1959. (Redrawn after Wichardt et al. 1989.)



Figur 9. Utbredelse til furunkulose i svenske oppdrettsanlegg 1961-1966. (Tegnet etter Wichardt et al. 1989.) - Distribution of furunculosis in Swedish fish farms 1961-1966. (Redrawn after Wichardt et al. 1989.)



Figur 10. Utbredelse av furunkulose i svenske oppdrettsanlegg 1973-1977. (Tegnet etter Wichardt et al. 1989.) - Distribution of furunculosis in Swedish fish farms 1973-1977. (Redrawn after Wichardt et al. 1989.)



Figur 11. Utbredelse av furunkulose i svenske oppdrettsanlegg 1980-1986. (Tegnet etter Wichardt et al. 1989.) - Distribution of furunculosis in Swedish fish farms 1980-1986. (Redrawn after Wichardt et al. 1989.)

4. Økologisk kunnskap i forhold til konsekvensutredning for GMO

Vi vil her se på i hvor stor grad den kunnskapen som er gjengitt ovenfor gir grunnlag for å besvare de spørsmål som finnes i DN's "Spørsmål som skal besvares i en konsekvensutredning ved utsetting av genmodifiserte organismer (GMO) til miljøet". I denne analogistudien vil vi betrakte *A. s. salmonicida* som tenkt mottaker. I denne forbindelse er det malens kapittel B som det er relevant å kommentere. Vi vil ikke besvare spørsmålene, men angi i hvilken grad det er mulig å besvare dem. Noen spørsmål er irrelevante i forhold til denne analogimodellen og er derfor utelatt her.

Ad del B. Informasjon om den umodifiserte organismen (mottaker)

1. Angi hva slags organisme mottaker er.

Kan besvares, se denne utredningen.

2. Karakterisering av organismen med opplysninger om dens systematiske plassering, trivialnavn, vertsspektrum og holotype.

Kan besvares til en viss grad. Usikkerhet knytter seg særlig til spørsmål om vertsspektrum. Se denne utredningen.

Kommentar:

Ut fra litteraturen kan vi svare på hva slags organisme denne bakterien er, og gi en karakteristikk av den. Selv om *A. s. salmonicida* er en godt beskrevet patogen bakterie, er det likevel verdt å merke seg at det fremdeles hersker usikkerhet om hvorvidt dette er en obligat eller fakultativ patogen bakterie, og hvorvidt den kan overleve intracellulært i fagocytter (Austin og Austin 1987, Rose et al. 1990). Det går også en diskusjon om hvilke egenskaper som er viktige for bakteriens patogenitet; mange av resultatene er motstridende og store deler av forskningen er basert på *in vitro* studier (Austin og Austin 1987).

3. Organismens utbredelse og naturlige habitat.

a) Utbredelse i Norge:

For besvarelse av dette spørsmålet har man bare den kjente utbredelsen av fiskesykdommen furunkulose. En eventuell utbredelse ut over dette er ikke kjent. Se denne utredningen.

b) Når ble organismen innført til Norge, og har den etablert ville bestander?

Kan besvares med visse forbehold. Se denne utredningen.

c) Fullstendig beskrivelse av organismens livssyklus:

Kan besvares med hensyn til stadier i fisk. Se denne utredningen.

d) Organismens naturlige habitat eller reservoir, for alle stadier i organismens livssyklus:

Kan bare besvares ufullstendig. Se denne utredningen.

e) Beskrivelse av interaksjoner med andre organismer (mennesker, dyr, planter, mikroorganismer og vira):

Kan bare besvares med hensyn til interaksjoner på det fysiologiske /cellebiologiske /molekylærbiologiske nivå særlig i forhold til laks, i noen grad for noen andre fiskearter. Det meste ut over dette er lite kjent. Se denne utredningen.

4. Har organismen nære slektninger i norsk natur som den kan danne hybrider eller foreta genetisk rekombinasjon med?

Bakterien har nære slektninger. Se denne utredningen. Kan ikke besvares med hensyn til de genetiske forholdene.

Kommentar:

Hvorvidt det kan dannes hybrider mellom de tre underartene av *A. salmonicida*-komplekset er ikke kjent, men det foreligger såpass mye usikkerhet rundt den taksonomiske plasseringen av de enkelte underartene at de vanligvis omtales under ett (Paterson 1983, Austin og Austin 1987). Carlson (1992) hevdet at fordi bakterier formerer seg ved celle-delning er arvematerialet spredd på en annen måte enn for høyere organismer. Dette gjør at klassifikasjonen av bakterier burde være basert på bakteriens enkelte gener og ikke bakterie-cellen, fordi gener har spredd seg blant bakteriene helt uavhengig av hverandre blant annet ved utveksling av plasmider. Derfor fremsetter Carlson (1992) påstanden om at det finnes bare en bakterie med mange varianter.

5. Opplysninger om foredling, seleksjon og genmanipulering:

Bli ikke besvart i denne utredningen.

6. Gi opplysninger om følgende karakteristiske egenskaper ved organismen.

a) Er organismen autotrof eller organotrof?

Forekomsten av eventuelle ikke-parasittiske stadier er usikker.

b) Gi en beskrivelse av organismens patogene og toksiske egenskaper:

Patogene egenskaper er best kjent i forhold til laks, lite kjent i forhold til mange andre arter av fisk. Se denne utredningen.

d) **Gi en beskrivelse av metoder benyttet til bekjempelse og behandling. Gi også opplysninger om metodenes sensitivitet og effektivitet:**

Metoder for bekjempelse og behandling kan besvares for laboratorie og oppdrettsanlegg, ikke for åpne situasjoner i naturen. Noen sparsomme opplysninger finnes om metodenes sensitivitet og effektivitet. Se denne utredningen.

e) **Er organismen resistent mot antibiotika?**

Det finnes noen opplysninger om antibiotika-resistente strains av bakterien, men dette er ikke behandlet i denne utredningen.

f) **Skiller organismen ut produkter med biologisk aktivitet (hormoner, enzymer, antibiotika o.l.) i levende eller død tilstand?**

Forhold vedrørende utskillelse av biologisk aktive stoffer kan sannsynligvis besvares, men er ikke belyst i denne utredningen.

g) **Inneholder organismen plasmider, lysogene vira eller transposoner? I tilfelle, hva er kjent om disse?**

Forhold vedrørende plasmider, lysogene vira eller transposoner er neppe fullstendig kjent, men man vet at bakterien inneholder plasmider, og at disse kan utveksles. Ikke videre berørt i denne utredningen.

h) **Kan virus-DNA integreres i vertscellekromosomene?**

Man vet sannsynligvis om virus DNA kan integreres i vertscellekromosomene. Ikke besvart i denne utredningen.

Kommentar:

Det er funnet stor homogenitet mellom plasmidprofilene innenfor et geografisk område i Nord-Amerika (Bast et al. 1988), noe som kan tyde på en betydelig utveksling av plasmider mellom bakteriecellene.

7. Metoder for påvisning og identifikasjon.

a) I laboratoriet. Kan besvares. Se denne utredningen.

b) Under feltbetingelser. Kan ikke besvares. Se denne utredningen.

Kommentar:

Påvisning av bakterien ved fravær av kliniske symptomer er et problem som ulike forskere har forsøkt å finne en løsning på, men det hersker fortsatt en oppfatning av at problemet ikke er løst (Austin og Austin 1987).

8. Opplysninger om reproduksjon.

a) **Reproduksjonsmåte:**

Kan bare delvis besvares. Se denne utredningen.

b) **Gi opplysninger om faktorer av betydning for reproduksjonsevnen:**

Kan delvis besvares særlig for laboratorieforhold, i liten grad for naturforhold. Se denne utredningen.

9. Opplysninger om generasjonstid og livslengde.

a) **Veksthastighet, livslengde eller overlevelsestid i naturlige økosystemer:**

Kan ikke besvares for naturforhold. Se denne utredningen.

c) **Veksthastighet under optimale laboratorieforhold:**

Kan besvares. Se denne utredningen.

Kommentar:

De studier som finnes over dette temaet angir hvor lang tid det tar fra fisken er infisert til den viser kliniske symptomer på furunkulose, eller at bakterien kan påvises i prøver fra forskjellige organer (Austin og Austin 1987). Men man vet imidlertid lite om hvor lang tid det tar fra fisken er infisert til den begynner å avgi bakterier til vannet. Ut over dette vet man lite om bakteriens reproduksjonsbiologi.

10. Overlevelsessevne.

a) **Er det spesielle hvile eller overlevelsesstadier i organismens livssyklus?**

Kan ikke besvares for naturforhold. Se denne utredningen.

b) **Overlevelsessevne i naturlige økosystem og faktorer som er begrensende for overlevelsessevnen:**

Kan ikke besvares.

c) **Kan organismen forekomme i levende, men ikke dyrkbar tilstand?**

Kan delvis besvares. Se denne utredningen.

Kommentar:

Flere review-artikler er skrevet om denne bakteriens biologi (McCarthy 1980, McCarthy og Roberts 1980, Austin og Austin, 1987), og det kan se ut som at bakterien kan være frittlevende i kortere tidsrom. Dette er nødvendig for at bakterien skal spre seg til nye verter. I tillegg finnes det indikasjoner på at bakterien kan forekomme i levende, men ikke dyrkbare celler (dvs. at den ikke kan påvises med vanlige metoder) (Austin og Austin 1987). Slike stadier kan være svært viktig for bakteriens overlevelse i miljøet, og også for dens spredningsevne. Derfor vil det være viktig å

undersøke slike aspekter ved biologien til en GMO som skal slippes ut i miljøet.

11. Hva vet man om organismens spredningsevne?

Kan ikke besvares. Se denne utredningen.

12. Gi en beskrivelse av abiotiske forhold som kan påvirke overlevelse, formering og spredning (f.eks. vind, strøm, temperatur, salinitet, pH o.l.)

Kan ikke besvares.

Denne gjennomgangen antyder at selv for en organisme som på grunn av sin økonomiske betydning har vært underlagt betydelig mengde forskning, er kunnskapsnivået begrenset i forhold til det man ønsker i denne sammenheng. Utviklingen av en GMO vil, antagelig i betydelig grad, øke den laboratoriebaserede kunnskapen om organismen, men neppe den økologiske kunnskapen man trenger i forhold til en eventuell uønsket spredning i naturen.

5. Diskusjon. Hva gjør man hvis...?

Bruken av *A. s. salmonicida* som analog for en unnsluppet GMO forutsetter at de observasjonene som er gjengitt her beskriver spredning etter introduksjon. Det vanlige for mikrober er at "alle finnes overalt" (Goksøyr og Torsvik 1992) fordi spredningen går raskere enn evolusjonen, slik at det ikke oppstår noen vesentlig geografisk fordeling av slekter og arter av bakterier (Goksøyr og Torsvik 1992). Hvis dette er tilfellet; dvs. at *A. s. salmonicida* finnes naturlig overalt, er det ikke et spredningsforløp som studeres, men en sekvens av epidemiske utbrudd som sannsynligvis styres av andre faktorer enn hva som er tilfellet ved en spredning. Studien til Barbour og Fish (1993) av borreliose (Lyme disease) er et eksempel på hvordan andre forhold enn introduksjon kan forklare epidemier fordelt i tid og rom.

Et annet problem med datasettet er at det beskriver forekomsten av *A. s. salmonicida* koplet til forekomsten til fiskesykdommen furunkulose. Det gir derfor begrenset informasjon om utbredelsen til bakterien hvis bakterien kan være tilstede uten at det blir sykdomsutbrudd. Dette har videre relasjon til den geografiske og tidsmessige sekvensen av observasjoner. Særlig i de britiske dataene kan man tenke seg at tids- og lokalitet-sekvensen i stor grad er et resultat av hvordan arbeidet til komiteen som undersøkte furunkulosen utviklet seg, antagelig stadig lengre mot nord, og i Skottland med en konsentrasjon om østkysten. Tilsvarende mangel på uavhengighet er det nok i større eller mindre grad også i det svenske og det norske datasettet.

Litteraturen tolker imidlertid entydig forløpene av observasjonene som er gjengitt ovenfor som et uttrykk for spredning av *A. s. salmonicida*. Vi velger å ta utgangspunkt i dette med hensyn til de britiske, svenske og norske observasjonene for det formålet vi har angitt for denne rapporten. Vi vil anta at en genmodifisert *A. s. salmonicida* er blitt utviklet som vaksine for oppdrettsfisk og er antatt unnsluppet fra ett eller flere anlegg. Vi antar i utgangspunktet at man vil ønske å fjerne den unnslopne GMO fra naturen igjen ved å bekjempe den fra starten av i de lokaliteter den blir spredd til. Selv om den unnslopne GMO for eksempel kan fremkalle en mild form for furunkulose hos fisk, er det ikke mulig å oppnå kontroll ved å avvente rapporter om sykdomsutbrudd før man forsøker å påvise GMO i en lokalitet. Kontroll og bekjempelse vil kreve et overvåkingsprogram som ved prøvetaking påviser GMO snarest mulig etter spredning til en ny lokalitet. Et slikt program forutsetter at man vet

hvor, når og hvordan man må ta prøver for å påvise GMO.

GMO vil kunne finnes i fisk, men i tillegg kan man ikke se bort fra at den kan være i andre organismer i vann, i vannet selv og i sediment. Det er grunn til å anta at praktiske så vel som metodiske begrensninger vil avgrense programmet til å ta prøver av fisk, og videre til prøver av visse arter av fisk av visse størrelser. Disse avgrensningene medfører en ikke kjent risiko for ikke å påvise GMO som er til stede i en lokalitet.

Når man har bestemt hva man skal ta prøver av, må man finne frem til hvor mange prøver (fisk) man vil ta i hver lokalitet som skal overvåkes. Dette avhenger bl.a. av følsomheten til den metoden man har valgt for å påvise GMO, hvor prevalent infeksjonen er, og hvilken prøvesikkerhet man ønsker å arbeide med. For å drøfte dette antar vi at de metodene som er beskrevet foran for å påvise *A. s. salmonicida* i fisk også kan anvendes for å påvise GMO. Man kan også tenke seg at det i forbindelse med utviklingen av GMO er utarbeidet en meget følsom PCR-teknikk for å påvise den (Kolstø og Prydz 1994). Ved valg av diagnostisk metode vil en også måtte gjøre valg av hvordan undersøkelsen av den enkelte fisk skal utføres. Det er vanlig her å begrense dette til enkelte organsystemer eller vev som f.eks. de fremre deler av nyrene. Slike begrensninger medfører igjen en risiko for å ikke oppdage en infeksjon som er tilstede. Følsomheten til "laboratoriemetoden" er imidlertid bare én faktor i oppdagelseskraften i prøvetakingen. Det antall prøver (fisk) som kan undersøkes er en annen viktig faktor. Da forskjellige delfag innenfor biologien bruker begreper knyttet til prøvetaking på forskjellig måte, er det nødvendig å definere vår fortsatte bruk av noen begreper her. Følsomheten til en diagnostisk metode (f) er proporsjonen av diagnostiserte positive til det totale antall som er positive av de undersøkte prøvene (fiskene). Prevalens (p) av infeksjonen er det antallet av fisker (D) i lokaliteten som har GMO i forhold til det totale antall fisker (N) i lokaliteten, dvs. at prevalensen er D/N . Vi må imidlertid anta at den diagnostiske metode vi bruker ikke er 100% følsom, dvs i stand til alltid å påvise GMO når den er tilstede. Vi kan derfor bare finne en observerbar prevalens som blir proporsjonen av observerbart infiserte fisk; dvs D_{obs}/N . Det følger av dette at oppdagelseskraften i et prøvetakingsprogram kan økes ved å velge diagnostisk metode med høyere følsomhet og/eller øke antallet av fisk som undersøkes.

Selv om vi gjør den urealistiske forutsetningen at den diagnosemetoden vi har til rådighet er 100% følsom slik at en infisert fisk alltid blir påvist, vil selve prøveinnsamlingen (fangst av fisk) medføre et element av tilfeldighet. Det er vanlig i slik

prøvetaking å forsøke og oppnå at denne "feilen" i prøvetakingen (a) ikke er større enn 5%. Dette tilsvarer at om man kunne ta et ubegrenset antall prøver som hver inneholder det antall fisk man har bestemt seg for, ville infeksjonen bli påvist i bare 95 av 100 prøvesett (noe som gir 5% feil). Forholdet mellom det antall fisk (n) som en prøve må inneholde for å oppdage en infeksjon med en prøvetakingsfeil a , med en følsomhet f hos diagnosemetoden, og med en prevalens p hos fiskene i lokaliteten er $n = -\ln a / f \cdot p$ (des Clers 1993).

Om man har som målsetting å kunne påvise GMO når 10% av fiskene i lokaliteten er infisert med en prøvesikkerhet på 5% og man har en diagnostisk metode med en følsomhet på 80%, så må man undersøke 38 fisk fra hver lokalitet. I en situasjon med en unnsloppet GMO vil man sannsynligvis ønske at den lokale prevalens ikke skal komme over i hvertfall 0.1% før man kan sette i verk tiltak. Da vil antall fisk man må ta prøve av stige til 3800. Om man i tillegg ville kreve en prøvesikkerhet på 1% stiger tallet til 5800. En forbedring av følsomheten til den diagnostiske metoden til 95% vil redusere dette tallet til 4600 fisk. Disse tallene baserer seg på en ideell forventning om at infeksjonen er tilfeldig (Poisson) fordelt i fiskepopulasjonen. Sannsynligvis vil den være klumpet fordelt noe som øker kravene til antall undersøkte fisk på en komplisert måte.

Når man har funnet ut hvor mange fisk man vil undersøke fra hver lokalitet, og hvordan fiskene skal undersøkes for å påvise GMO, må man finne ut i hvilke lokaliteter man skal samle inn fiskeprøvene. Dette må ideelt basere seg på kunnskap om to elementer av GMO's spredningsevne; evnen til forflytning og evnen til å kolonisere. At disse egenskapene kan være sterkt situasjonsbetinget viser forskjellene i forløpene til furunkulose-epidemiene i Norge i perioden 1964-1979 og fra 1985 og utover. Generelt kan man bare karakterisere i helt grove trekk de lokaliteter som er koloniserbare for en gitt art. Forståelse av koloniserbarhet er ett av de felter i økologien som trenger øket forskningsinnsats. De kunnskapene man har om *A. s. salmonicida* gir ikke mulighet for å karakterisere de lokaliteter den har etablert seg i ut over at de er habitat med fisk. Om fisk er obligatorisk er imidlertid ikke entydig. Man må i alle fall å betrakte alle fiskepopulasjoner som koloniserbare.

Det er et velakseptert biologisk forutsetning at enhver art må ha en kapasitet for romlig spredning som integrert del av sin biologiske utrustning. Den ekspansjon i utbredelsen til *A. s. salmonicida* i Storbritannia, Sverige og Norge som er beskrevet foran er ansett for å ha skjedd ved menneskelig virksomhet, bortsett fra spredningen fra anlegg til elver i Norge som har skjedd med rømt oppdrettsfisk. Alle spredningsmønstrene slik de

fremkommer av de kartfremstillingene (Figurene 2-11) består av en komplisert sammensetning av hastigheter og retninger. Hva av dette som er antropogent og hva som er "naturlig" er det ikke uten videre lett å se. Forståelse av arters spredningsmekanismer med vekt på deres effektivitet er også et felt hvor det er behov for økt økologisk forskning. Det er gjort forsøk på å måle spredningsevne ved plassering av "feller" for den aktuelle artens spredningstadier i økende, men som regel liten avstand fra kildenbestanden. Man har da, ikke overraskende, funnet en avtagende konsentrasjon av spredningsstadier med avstanden fra kilden, og at den målbare konsentrasjonen av spredningstadier blir null etter en ganske kort avstand. Dette er ikke overraskende i seg selv, og har liten verdi i vår sammenheng her. Den vide utbredelsen til mange arter med liten eller ingen egenbevegelse må bety at andre effektive transportmekanismer finnes. Spredningspotensialet til *A. s. salmonicida* kan bl.a. være knyttet til fisk og til fiskepisende fugl og pattedyr. Bakterien kan kanskje også fraktes med vann. I det "rollespillet" vi har laget her synes det derfor å være gode grunner til å basere seg på den kapasiteten til romlig forflytning som man har observert i Storbritannia, Sverige og Norge. Et forsiktig estimat på dette grunnlaget kan være at *A. s. salmonicida* kan gjøre sprang på i hvertfall 300 km slik at man må legge ut et prøvetakingsnett over koloniserbare lokaliteter innenfor en slik radius. En overvåking i en slik dimensjon vil selvfølgelig gi et meget stort antall lokaliteter som det skal undersøkes et stort antall fisk fra. Dette måtte i tillegg gjennomføres rutinemessig med en fastlagt frekvens som måtte være høy om målsettingen om oppsporing og utryddelse av GMO i en tidlig etableringsfase skulle kunne oppfylles.

6. Konklusjoner

Denne analysen har vist at selv om kunnskapene om *A. s. salmonicida* er omfattende og detaljerte på mange felter, så er de økologiske kunnskapene som er relevante for kontroll av en uønsket spredning i naturen svært mangelfulle. Den forskningen i laboratoriene som ville kreves for å fremstille en GMO vil ikke i seg selv redusere denne mangelen på økologisk kunnskap.

Gitt den kunnskapen som foreligger ville en målsetting om påvisning og utryddelse av en unnsloppet GMO analog til *A. s. salmonicida* kreve et så omfattende overvåkingsprogram at det ikke er praktisk gjennomførbart. Selv om kunnskapen om en GMO's evne til å spre seg var bedre kjent på forhånd slik at sannsynlige lokaliteter i større grad kunne avgrensnes, ville likevel omfanget av prøvetaking bli for stort til at det kunne gjennomføres. I tillegg vil det alltid være en nedre grense for påvisning. Om man antar at GMO har unnsloppet til det marine miljø blir et troverdig program for prøvetaking klart umulig. GMO som kan overleve i vanlig forekommende habitat, og som har ett eller flere stadier som må påvises ved hjelp av prøvetaking er derfor ute av kontroll fra det øyeblikk de unslipper til naturen. Naturprosessen selv vil da avgjøre i hvilken grad GMO blir etablert. En effektiv barriere mot etablering i naturen vil bare foreligge for GMO som med sikkerhet ikke kan overleve og formere seg under våre naturbetingelser. Prøvetaking slik som beskrevet her vil være prinsipielt tilsvarende for virus, bakterier, sopp, protister, insekter og andre invertebrater og planter med frøspredning.

Vi har ikke drøftet mulighet for utryddelse om man hadde mulighet til å påvise, men vanligvis regnes utryddelse som umulig å oppnå i åpne naturlige systemer.

Vi har gjennomført denne analysen ved å betrakte organismnivået. Om man betrakter gennivået vil de problemene som er belyst her i hovedsak bli forsterket.

Litteratur

- Adams, A. og Thompson, K. 1990. Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. - J.Aquat.Anim.Health 2:281-288.
- Amlacher, E. 1961. Taschenbuch der Fischkrankheiten. - Jena, Gustav Fischer Verlag.
- Austin, B. og Austin, D.A. 1987. Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. - Ellis Horwood Ltd.
- Barbour, A.G. og Fish, D. 1993. The biological and social phenomenon of Lyme Disease. - Science 260: 1610-1616.
- Bast, L., Daly, J.G., DeGrandis, S.A. og Stevenson, R.M.W. 1988. Evaluation of profiles of *Aeromonas salmonicida* as epidemiological markers of furunculosis infections in fish. - J.Fish Dis. 11:133-145.
- Bullock, G.L. og Stuckey, H.M. 1975. *Aeromonas salmonicida*: detection of asymptotically infected trout. - Prog.Fish-Cult. 37:237-239.
- Bylund, G. 1989. The present health state in fish farms in Nordic countries. - I: Parasites of freshwater fishes of North-West Europe. International symposium, Soviet-Finnish cooperation program, Petrozavodsk. s.13-20.
- Carlson, K. 1992. Det finns bara en bakterie! - Forskning och Framsteg 2:42-49.
- Christensen, N.O., Jensen, M. og Rasmussen, C.I. 1963. Fish diseases in Denmark. - Bull.Off.int.Epiz. 59(1-2):21-29.
- Cipriano, R.C. 1982. Furunculosis in brook trout: infection by contact exposure. - Prog.Fish-Cult. 44(1):12-14.
- Cornick, J.W., Chudyk, R.V. og McDermott, L.A. 1969. Habitat and viability studies on *Aeromonas salmonicida* causative agent of furunculosis. - Prog.Fish Cult. 31:90-93.
- Daly, J.G. og Stevenson, R.M.W. 1985. Importance of culturing several organs to detect *Aeromonas salmonicida* in Salmonid fish. - Trans. Am. Fish. Soc. 114:909-910.
- desClers, S. 1993. The statistical basis to detect infections and estimate their prevalence in tropical aquaculture. -Manuskript.
- DN 1991. Økologisk risiko ved utsetting av genmodifiserte organismer i naturen. - DN Rapport nr.7.
- DN 1993. Spørsmål som skal besvares i en konsekvensutredning ved utsetting av genmodifiserte organismer (GMO) til miljøet. - Upublisert utredning.
- Dubois-Darnaudpeys, A. 1977. Epidemiologie de la furunculose des salmonids II. Ecologie de *Aeromonas salmonicida*, proposition d'un modele epidemiologique. - Bull.Francais de Pisciculture 50:21-32.
- Emmerich, R. og Weibel, E. 1894. Ueber eine durch bakterien erzeugte seuche unter den forellen. - Archives fur hygiene und bacteriologie 21:1-21.
- Evelyn, T.P.T. 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the Sablefish, and from two species of cultured Pacific salmon. - J.Fish.Res.Bd.Can. 28:1629-1634.
- Fish, F.F. 1937. Furunculosis in wild trout. - Copeia 37:40.
- Geck, P. 1971. India ink immuno-reaction for the rapid detection of enteric pathogens. - Acta Microbiologica Academicae Scientiarum Hungaricae 18:191-196.
- Goksøyr, J. og Torsvik, V. 1992. Genetisk spredning av mikroorganismer. - Rapport fra Institutt for Mikrobiologi og plantefysiologi, Universitetet i Bergen.
- Halvorsen, O. og Hartvigsen, R. 1989. A review of the biogeography and epidemiology of *Gyrodactylus salaris*. - NINA utredning 2:1-41.
- Hindar, K. og Bakke, Ø. 1991. Miljøeffekter av utsetting av genmodifiserte organismer. - NINA oppdragsmelding 72:1-77.
- Holt, G. og Håstein, T. 1970. Furunkulose hos fisk i Norge. - Nord.Vet.-Med. 22,505-509
- Håstein, T. 1989. Fish diseases in Norway. Diagnoses and control 1967-1988. Report from the National Veterinary Institute.
- Håstein, T. 1990. Furunkulose som sykdom. Referat/kommuniké fra møte om furunkulose 17. januar 1990, Bergen. Norges Fiskeriforskningsråd.
- Håstein, T., Saltveit, S.J. og Roberts, R.J. 1978. Mass mortality among minnows in lake Tveitevatn, Norway, due to an aberrant strain of *Aeromonas salmonicida*. - J.Fish Dis. 1:241-249.
- Johnsen, B.O., Møkkelgjerd, P.I. og Jensen, A.J. 1993. Furunkulose i norske vassdrag. - Statusrapport. - NINA forskningsrapport 38:1-73.
- Kimura, T. 1970. Studies on a bacterial disease of adult "Sakuramasu" and pink salmon reared for

- maturity. - Scientific report of the Hokkaido salmon hatchery 24:9-100.
- Kimura, T. og Yoshimizu, M. 1983. Coagglutination test with antibody sensitized staphylococci for rapid and simple serological diagnosis of fish furunculosis. -Fish Path.17:259-262.
- Kimura, T. og Yoshimizu, M. 1984: Coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid serological identification of rough strains of *Aeromonas salmonicida*. - Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.50: 439-442.
- Klontz, G.W., Yasutake, W.T. og Ross, A.J. 1966. Bacterial diseases of the salmonidae in the western United States: pathogenesis of furunculosis in rainbow trout. - Am.J.Vet.Res. 27(120):1455-1460.
- Klontz, G.W. og Anderson, D.P. 1968. Fluorescent antibody studies of isolates of *Aeromonas salmonicida*. - Bull. Off. int.Epiz. 69:1149-1157.
- Kolstø, A.-B. og Prydz, H. 1994. Deteksjon av genspredning ved hjelp av PCR-teknikk. Bioteknologisenteret i Oslo / Universitetet i Oslo. Rapport.
- Krieg, N.R. og Holt, J.G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lange, J. og Ljungberg, O. 1962. Utbredningen av furunkulos hos fisk i Sverige under åren 1951-1960. -Nord.Vet.-Med. 14:177-191.
- Ljungberg, O. og Johansson, N. 1977. Epizootologiske studier på atypiske *Aeromonas salmonicida* infeksjoner av salmonider i svenske fiskerier 1967-1977. - Bull.Off.int.Epiz. 87(5-6):475-478.
- Lunder, T. og Håstein, T. 1990. Infeksjoner med *Aeromonas salmonicida*. - I: Poppe, T. (ed.) Fiskehelse. Sykdommer-behandling-forebygging. John Grieg Forlag, s.140-146.
- Markwardt, N.M, Gocha, Y.M. og Klontz, G.W. 1989. A new application for Comassie Brilliant Blue agar: detection of *Aeromonas salmonicida* in clinical samples. - Dis. Aquat. Org. 6:231-233.
- Masterman, A.T. og Arkwright, J.A. 1911. Report, Board of Agriculture and Fisheries, U.K.
- Mackie, T.J., Arkwright, J.A., Pryce-Tannatt, T.E., Mottram, J.C. og Johnstone, W.R. 1930. Interim report of the furunculosis committee. - Edinburgh H.M.S.O..
- Mackie, T.J., Arkwright, J.A., Pryce-Tannatt, T.E., Mottram, J.C. og Johnstone, W.R. 1933. Second report of the furunculosis committee. - Edinburgh H.M.S.O..
- Mackie, T.J., Arkwright, J.A., Pryce-Tannatt, T.E., Mottram, J.C. og Johnstone, W.R. 1935. Final report of the furunculosis committee. - Edinburgh H.M.S.O..
- Marsh, M.C. 1902. *Bacterium truttae*, a new bacterium pathogenic to trout. - Science 16:706.
- Mawdesley-Thomas, L.E. 1969. Furunculosis in the goldfish *Carassius auratus*. - J.Fish Biol. 1:19-23.
- McCarthy, D.H. 1980. Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. - I: Aquatic Microbiology. Symp.Soc.Appl.Bacter., no.6, s.299-324.
- McCarthy, D.H. 1975. Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue. - J.Gen.Microbiol. 88:384-386.
- McCarthy, D.H. 1977. Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. - I: Skinner, F.A. og Shewan, J.M. (eds.): Aquatic microbiology. London:Academic Press, s.299-324.
- McCarthy, D.H. og Roberts, R.J. 1980. Furunculosis of fish - the present state of our knowledge. - I: Droop, M.A. og Jamasch, H.W. (eds.): Advances in Aquatic microbiology. London:Academic Press, s.293-341.
- McCarthy, D.H. og Whitehead, P. 1977. An immuno-ink technique for rapid laboratory diagnosis of fish furunculosis. - J.Appl.Bact. 42:429-431.
- McCormick, W.A., Stevenson, R.M.W. og MacInnes, J.I. 1990. Restriction endonuclease fingerprinting analysis of Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida*. - Can.J.Microbiol. 36:24-32.
- Mettam, A.E. 1914. Report on the outbreak of furunculosis in the River Liffey in 1913. -Scientific investigations no.II. Dept. of Agriculture and Technical instruction for Ireland, Dublin.
- Mooney, H.A. og Bernardi, G. 1990. Introduction of genetically modified organisms into the environment.- SCOPE 44. John Wiley & Sons.
- Ojala, O. 1963. Fish diseases in Finland. - Bull.Off.int.Epiz.59(1-2):31-42.
- Paterson, W.D. 1983. Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. - I: Anderson, D.P., Dorson, M. og Dubourget, P.H. (eds.) Antigens of fish pathogens. Collection foundation, Marcel Merieux, s. 119-137.
- Paterson, W.D., Douey, D. og Desautels, D. 1980. Relationships between selected strains of typical and atypical *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila* and *Haemophilus piscium*. - Can.J.Microbiol. 26:588-598.

Plehn, M. 1909. Die furunculose-epidemie der salmoniden in Suddeutschland. - Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, infektionskrankheiten und Hygiene, Originale, Abteilung I L11, 468.

Plehn, M. 1911. Die furunculose der salmoniden. - Zentralblatt für Bateriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Originale, Abteilung I 60:609-624.

Popoff, M. 1984. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936. - I: Krieg, N.R. og Holt, J. (eds.) Bergey's Manual of systematic bacteriology vol.1, s.545-548. Williams og Wilkins, Baltimore.

Popoff, M. og Lallier, R. 1984. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. - Methods Microbiol. 16:127-145.

Rose, A.E., Ellis, A.E. og Munro, A.L.S. 1990. The survival of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in sea water. - J.Fish Dis. 13:205-214.

Sakai, M., Atsuta, S. og Kobayashi, M. 1986. Comparative sensitivities of several diagnostic methods to detect fish furunculosis. - Kitasato Arch. of Exp. Med. 59:43-48.

Scott, M. 1968. The pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* in sea and brackish water. - J.Gen.Microbiol. 50:321-327.

Smith, I.W. 1962. Furunculosis in kelts. - Fresh. and Salmon Fish.res. 27:1-5.

Smith, P.D.1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Aeromonas salmonicida* in diseased fish tissue. - Develop.biol.Standard. 49:97-100.

Wichardt, U.-P., Johansson, N. og Ljungberg, O. 1989. Occurrence and distribution of *Aeromonas salmonicida* infections on Swedish fish farms, 1951-1987. - J.Aqua.Anim.Health 1:187-196.

Whittington, R.J., Gudkovs, N., Carrigan, M.J., Ashburner, L.D. og Thurstan, S.J. 1987. Clinical, microbiological and epidemiological findings in recent outbreaks of goldfish ulcer disease due to atypical *Aeromonas salmonicida* in south-eastern Australia. -J.Fish Dis. 10:353-362.

Whittington, R.J. og Cullis, B. 1988. The susceptibility of salmonid fish to an atypical strain of *Aeromonas salmonicida* that infects goldfish, *Carassius auratus*, in Australia. - J.Fish Dis. 11:461-470.

293

nina
oppdrags-
melding

ISSN 0802-4103
ISBN 82-426-0491-6

Norsk institutt for
naturforskning
Tungasletta 2
7005 Trondheim
Tel. 73 58 05 00