

# Nýrnaveiki í laxfiskum: greining sýkingar og framvinda sjúkdóms

Fisksjúkdómadeild  
Tilraunastöð H.Í. í meinafræði  
Keldum v/Vesturlandsveg

*Verkefnisstjóri*  
Sigríður Guðmundsdóttir

*Meðumsækjendur*  
Árni Kristmundsson  
Sigurður Helgason  
Sunna Sigurðardóttir

*Starfsmenn*  
Ívar Örn Árnason  
Harpa Lind Björnsdóttir

Lokaskýrsla til AVS 2010

R 076-07

## Ágrip

Markmið verkefnisins voru að bæta greiningu nýrnaveikibakteríunnar *Renibacterium salmoninarum* (*R. salmoninarum*) og auka þekkingu á framvindu smits í einstaklingum og hjörðum. Í því skyni voru þróaðar nýjar PCR aðferðir, sem greina kjarnsýrur bakteríunnar og þær bornar saman við niðurstöður sem fengust með beitingu PCR aðferða frá öðrum rannsóknastofum auk tvenns konar ELISA prófa, sem greina mótefnavaka bakteríunnar.

Í upphafi verkefnisins var þróuð s.k. snPCR aðferð sem reyndist jafnnæg og nPCR, aðferð sem OIE, Alþjóða dýraheilbrigðisstofnuninni, mælir með. Prófuð voru sýni úr ýmsum líffærum nokkurra hópa. Í fyrsta hópnum var eldislax með virka sýkingu, þá eldisbleikja þar sem grunur var um smit og loks var villtur fiskur, lax, bleikja og urriði tekin úr Elliðaám og Elliðavatni á mismunandi tímum. Að lokum var uppsöfnun utanfrumuafurða bakteríunnar í nýra laxfiska könnuð með því að sprauta þeim í seiði úr eldisstöð, þar sem nýrnaveiki var ekki til staðar.

Við greiningu á smiti reyndust snPCR og nPCR greina fleiri jákvæð sýni en s.k. rauntíma PCR aðferðir sem þróaðar voru og prófaðar í verkefninu eða aðrir hópar höfðu komið fram með. sn-PCR og n-PCR prófin reyndust álíka næm greiningartæki og pELISA-aðferð þar sem notuð eru fjölstofna mótefni til að nema mótefnavaka bakteríunnar. Þessi próf eru því samkvæmt niðurstöðum verkefnisins hentugust til að staðfesta sýkingu í hópum þar sem greinst hefur nýsmit með ELISA aðferð. Vegna samanburðar við erlendar rannsóknir var keypt ELISA-kitt frá BiosChile, þar sem einstofna mótefni eru notuð til greiningar á mótefnavökum bakteríunnar. Greiningarhæfni þessa prófs reyndist afar lítil og gagnsemi þess því engin við íslenskar aðstæður.

snPCR og nPCR voru mjög samhljóða í sýnum úr sýktri eldishjörð. Við prófanir á sýnum úr villtum fiski greindust fleiri sýni jákvæð með nPCR en snPCR. sn-PCR prófið mun einfaldara og ódýrara en nPCR, auk þess sem mengunarhætta í prófinu sjálfu er hverfandi.

Ný aðferð við að einangra DNA, þar sem notaður var nota s.k. FTA pappír, reyndist ódýrari og einfaldar en hefðbundin einangrun með DNA-kitti. Notkun FTA býður einnig upp á þægilega og ódýra geymslu sýna. Afrakstur við notkun DNA-kitts má bæta með aukaskrefi sem prófað var í rannsókninni, en eftir sem áður gefur FTA einangrun marktækt betri árangur.

Mælingar á villtum fiski og samantekt gagna á Fisksjúkdómadeild, sýna að hlutfall smitaðara fiska hefur aukist gríðarlega á undanförunum árum. Í Elliðavatni hefur þetta haldist í hendur við hækkun á meðalhita vatnsins og husanlega er slík breyting megin skýringin í fleiri vatnakerfum. Aukið smit í staðbundnum silungastofnunum leiðir að öllum líkindum til aukins smitmagns í tengdum ám.

Könnuð var uppsöfnun mótefnavaka úr utanfrumuafurðum bakteríunnar í nýrum laxaseiða sem fengu þau með sprautu í kviðarhol. Með pELISA, þar sem notuð eru fjölstofna mótefni og mELISA með einstofna mótefnum, var hægt að sýna fram á að mótefnavakarnir höfðu borist í nýra tveimur dögum síðar. Eftir 2 vikur var magn MSA próteinsins lækkandi.

Með margvíslegum samanburði var athugað hvort tálknasýni eða hrognavökvi kynnu að henta til skimunar fyrir *R. salmoninarum*. Niðurstöður sýna ótvírætt að svo er ekki og verða nýrnasýni því áfram notuð við alla almenna sýnatöku.

## Abstract

The main aim of the project was to improve detection of *R. salmoninarum* infection and gather knowledge on bacterial kidney disease in individuals as well as in groups of salmonid fish. A semi-nested PCR test, snPCR, was constructed that detects sequences from the *msa* gene of the bacterium. Various methods of sample preparations were used and compared. One of them involving so called FTA paper, gave the best results. The paper contains reagents and enzymes that lyse cells and degrade proteins in the samples, while retaining nucleic acids.

Semi-nested PCR was shown to be cheaper and less time consuming than nPCR. Both tests have similar sensitivity limit and detection capabilities comparable to ELISA, when testing samples from a group of salmon broodfish with active infection. Using FTA for DNA isolation is more convenient than isolation with a DNA kit and DNA in the filter samples can be stored at room temperature for years. In the ELISA-test referred to above, polyclonal antibodies are used for antigen detection. A kit with monoclonal antibodies for detection was bought (BiosChile) and tested for comparison with very poor results. Testing of samples from wild fish showed local populations of Arctic char and brown trout in lakes with high percentage of fish positive in ELISA, many with high readings, but few individuals with positive snPCR or nPCR results. Samples from Atlantic salmon smolts as well as returning broodfish in the river showed that the fish got infected in the river water and that the percentage of positives, in ELISA, increased with time. All samples were negative in the PCR tests.

A reverse transcriptase real time or quantitative PCR test (RT-qPCR) was developed. Several methods for extracting RNA from *R. salmoninarum* in workable amounts from infected kidney samples and bacteria cultures were used to screen some of the samples for comparison and interestingly none of them gave better results than the cheaper and simpler sn-PCR or nPCR.

Six weeks after injection of extracellular products from *R. salmoninarum* culture, a decline in the average amount of the MSA antigen was observed using ELISA with monoclonal antibodies. This experiment was preliminary and aimed at defining concentrations and timelines for further studies on extracellular products and infection studies.

## Efnisyfirlit

	<b>Bls.</b>
<b>1. Inngangur</b>	<b>5</b>
<b>2. Efniviður og aðferðir</b>	<b>7</b>
<b>3. Niðurstöður</b>	<b>18</b>
<b>4. Umræða og ályktanir</b>	<b>31</b>
<b>5. Þakkarorð</b>	<b>37</b>
<b>6. Heimildir</b>	<b>38</b>
<b>7. Viðauki</b>	<b>40</b>

# 1. Inngangur

Meginmarkmið verkefnisins voru: “Að bæta greiningu og auka þekkingu á sýkingarferli nýrnaveikibakteríunnar *R. salmoninarum*. Í umsókn var lagt til að prófa mismunandi aðferðir, á sýnum úr ýmsum líffærum, einkum úr laxi og bleikju, við að greina og meta stig sýkingarinnar. Sumar aðferðanna voru þegar í notkun á rannsóknastofum, en aðrar voru þróaðar í verkefninu og prófaðar ásamt þekktum aðferðum. Þetta var nauðsynlegt svo unnt yrði að meta gildi þeirra og beita þeim af öryggi í framtíðinni. Ástæður fyrir því að hafa margs konar próf og sýnagerðir tiltæk, liggja í eðli sýkingarinnar, sem hefur mikla sérstöðu meðal helstu sjúkdómsvalda í laxfiskum. Kemur þar margt til:

- 1) bakterían og mótefnavakar hennar eru ekki jafndreifð um fiskinn
- 2) laxfiskar geta borið Rs mánuðum/árum saman áður en sjúkdómseinkenna verður vart
- 3) bakterían getur lifað vikum saman utan hýsils
- 4) bakterían getur smitast milli kynslóða inni í hrognum, svo hefðbundin sótthreinsun á yfirborði hroga dugar ekki til að hindra þá smitleið
- 5) bakterían greinist í ýmsum tegundum villtra laxfiska
- 6) sýklalyf vinna ekki á sýkingunni
- 7) nothæft bóluefni hefur ekki verið markaðssett
- 8) einangrun með ræktun, sem er staðal aðferð við bakteríugreiningu, tekur 2-12 vikur en einungis 2-5 daga fyrir flestar algengar fiskabakteríur.

Nýrnaveiki hefur valdið erfiðleikum við eldi laxfiska um allan heim. Brýnt er að bæta þekkingu á eðli smitsins bæði m.t.t. þess hvernig bakterían hagar sér í einstaklingum, hvaða munur er milli tegunda, hverjar eru helstu smitleiðir, hvernig samspili hýsils og sýkils er háttað og skapa þannig forsendur fyrir fjölbreyttum, fljótverkum og öruggum greiningaraðferðum. Það hefur mikla efnahagslega þýðingu bæði hérlandis og víða erlendis að hefta útbreiðslu bakteríunnar og uppræta uppsprettur smits.

Útgáfa heilbrigðisvottorða fyrir hrogn og fisk á öllum aldurstigum, vegna flutnings og sölu, byggir á niðurstöðum aðferða sem greina bakteríuna. Algengast er að beita einni fljótverkri aðferð til skimunar. Gefi skimun vísbendingu um smit í stöð, sem áður hefur verið smitfrí, þarf að staðfesta greiningu með annari aðferð. Alþjóða dýraheilbrigðisstofnunin (OIE) gerir kröfu um að smit í stöð eða eldishópi, þar sem bakterían greinist í fyrsta sinn, sé staðfest með tveimur aðferðum sem byggja á ólíkum eigindum, t.d. ELISA aðferð sem greinir mótefnavaka, einkum 57kD prótein og PCR, sem greinir erfðaeftni hennar. Ræktist bakterían, þarf ekki aðra aðferð til staðfestingar. Aðferðir sem OIE hefur samþykkt til notkunar við greiningar á *R.salm.* eru á veraldarvefnum ([http://oie.int/fr/normes/fmanual/A\\_00028.htm](http://oie.int/fr/normes/fmanual/A_00028.htm)) og hafa verið óbreyttar frá 2003.

Nýrnaveiki greindist í fyrsta skipti á Íslandi árið 1968 í laxaseiðum í eldisstöð við Elliðaár (Helgason 1985) og því næst í fiskeldisstöð 1977-78. Á árunum 1980-1990 jókst laxeldi hratt hérlandis og í ársbyrjun 1985 kom upp faraldur sem tengdist fjórum stórum eldisstöðvum (Gudmundsdóttir, Helgason et al. 2000). Í ljósi þeirrar reynslu hófst kerfisbundin skimun fyrir nýrnaveikibakteríunni í klakfiskum á Rannsóknadeild fisksjúkdóma á Keldum sem hefur staðið óslitið síðan. Fyrstu árin var notuð ræktun

(Benediktsdóttir, Helgason et al. 1991; Guðmundsdóttir, Helgason et al. 1991) og flúrlitun (Cvitanic, 1994), en frá 1991 hefur ELISA-prófi verið beitt (Guðmundsdóttir, Benediktsdóttir et al. 1993). Á hverju ári er skimað úrtak úr hópi klakfiska af mismunandi eldisuppruna í hverri stöð og allur villtur klakfiskur, sem notaður eru til uppbyggingar laxastofna í veiðiam, er skimaður fyrir bakteríunni. Þetta hefur skilað góðum árangri. Þannig fór smittíðni í hafbeitarstöðvum úr 40% árið 1986 niður í 0% árið 1992. Frá árinu 1992 til ársins 2003 var smit einungis greint í stöku tilfellum, þá einkum í villtum fiski, en bakterían er all algeng í laxfiskum í náttúrunni þótt hún valdi þar ekki merkjanlegum faröldrum (Jónsdóttir et al).

Árin 2003-2007/2008 herjaði nýrnaveiki á laxfiska í eldi og sums staðar kom smit upp aftur eftir sóttþreinsun. Á sama tíma jókst smittíðni mikið í villtum klakfiski og hefur sú þróun haldið áfram. Milljónum eldisseiða hefur verið fargað og nemur tjónið hundruðum milljóna króna. Í skýrslunni er gerð ítarleg grein fyrir faraldsfræði nýrnaveiki héraendis undanfarin ár. Þar eru teknar saman niðurstöður úr skimun og sjúkdóms-greiningum á fisksjúkdómadeild.

Í verkefninu sem hér eru gerð lokaskil, voru rannsökuð fjölbreytileg sýni úr öldum og villtum fiski, laxi, bleikju og urriða. Margar aðferðir voru prófaðar og mat lagt á notagildi þeirra með innbyrðis samanburði. Þegar upphafleg rannsóknáætlun var samin, var ráðgert að gera sýkingtilraunir til að kanna hvaða niðurstöður fengjust með mismunandi prófum á sýnum úr nýsmituðum fiski. Þar sem það dróst að bæta aðstöðu til smittitrauna í Sandgerðir, var brugðið á það ráð að safna sýnum úr Elliðavatni og Elliðaám, með það fyrir augum að afla nýsmitaðs efniviðar.

Rannsóknaniðurstöður ásamt dýrkeyptri reynslu af nýliðnum faraldri, hefa þegar verið notuð við endurskoðun á verklagsreglum bæði í eldi og fiskirækt, svo sem um flutning seiða milli stöðva og geymslu villtra klakfiska. Niðurstöður hafa verið kynntar með margvíslegum hætti og mun sú einnig verða raunin næstu misseri. Þá er nýtt rannsóknaverkefni er að hefjast þar sem gera á smittitraunir í bleikju og rannsaka ferli sjúkdómsins nánar.

## 2. Efniviður og aðferðir

### 2.1 Fiskur

#### Hópur 1

a) Klaklax úr eldi

Þessi fiskur klaktist árið 2003 í stöð A. Árið eftir voru seiðin flutt í stöð B, þar sem líkur benda til að smit hafi orðið. Áður en upp kom grunur þar um, voru seiðin flutt í sjókvíar og alin þar 2004-2006. Við sýnatöku í júní 2005 voru lág jákvæð ELISA gildi numin í nýrnasýnum nokkurra fiska, en einkenni nýrnaveiki voru ekki til staðar og eldið gekk vel. Sumarið 2006 var fiskurinn fluttur í ker á landi þar sem hrognataka var framkvæmd. Þá var safnað sýnum úr nýrum, tálknum og hrognavökva. Stöku fiskur var með stórsæ einkenni og einn slíkur var í sýnahópnum. Alls voru tekin sýni úr 40 fiskum.

b) Klakbleikja úr eldi

Í þessum hópi var grunur um smit. Tekin voru sams konar sýni úr 40 einstaklingum og lýst er fyrir klaklaxinn

c) Nýrnasýni, valin voru úr sýnum sendum Fisksjúkdómadeild

Sýnin voru notuð til að prófa aðferðirnar meðan verið að að þróa þær og bera saman.

#### Hópur 2

Í þessum hópi voru lax, urriði og bleikja, veidd á mismunandi tímum og á mismunandi stöðum í vatnakerfi Elliðaá og Elliðavatns. Sjúkdómseinkenni greindust ekki ekki í neinum fiskanna.

a) Villt smoltuð laxaseiði úr Elliðaám

Seiðin voru tekin í sleppitjörn á leið til sjávar í júní 2007 (n=20). Þegar þessi árgangur gekk í ána 2008, voru tekin sýni í júlí (n=22), ágúst (n=22), september (n=21) og desember (n=26). Hluti af fiskunum, sem voru veiddir í September, voru geymdir í kerri þar til í desember og sýni tekin úr þeim. Í kerinu var vatn úr ánni.

b) Villt bleikja (n=18) og urriði (n=60), veidd í Elliðavatni í október 2008.

c) Villtur urriði (n= 28), veiddur í Elliðavatni í ágúst 2009.

d) Sýni úr villtum urriða, sem til voru frá eldri tíma, úr s.k. Vatnaverkefni. Fiskurinn var veiddur í Mývatni og Lagarfljóti á árunum 1993-1995.

#### Hópur 3

Laxaseiði úr BKD frírri stöð (n=102) voru flutt að Keldum og alin í 170 L tönkum í rennandi, loftuðu, ferskvatni við 9°C. Eftir viku aðlögun, var fiskurinn sprautaður í kviðarhol, með tveimur mismunandi þynningum af utanfrumuafurðum nýrnaveikibakteríunnar *R. salmoninarum* úr vökvarækt, eða baðaður í sams konar lausn. Laxaseiðum sem sprautuð voru í kviðarhol var skipt í 5 hópa. Í byrjun voru tekin nýrnasýni úr 5 seiðum (hópur 1). Í hópi 2 voru 6 seiði sem fengu 0.1 ml af sterílu PBS. Í hópi 3 voru 4 seiði sem fengu 0.1 ml af KDM-2 vökvaæti sem þynnt var 1/100 til samræmis við bakteríulausnirnar. Í hópi 4 voru 40 seiði sem fengu 0.1 ml í kviðarhol af lausn sem innihélt 0.1 mg/ml af utanfrumuafurðum bakteríunnar og í hópi 5 voru 32 seiði sem fengu 0.1 ml í kviðarhol af lausn sem innihélt 1.0

mg/ml af utanfrumuafurðum. Seiði í öllum hópum voru einstaklingsmerkt með flúrljómandi fjölliðu (Visible implant fluorescent elastomer, Northwest Marine Technology, Inc. USA) og seiðum úr öllum meðhöndlunarhópum skipt jafnt milli tveggja eldiskera og handfóðraðir einu sinni á dag með 2mm þurrfóðri frá Laxá hf, Akureyri. Vigtun og sýnataka fóru fram 2, 7, 14, 28 og 42 dögum eftir meðhöndlun.

Í böðunartilraunina voru notuð 15 seiði. Þau voru höfð í 150 mín í 8 L af loftuðu ferskvatni sem innihélt 50 mg/L af utanfrumuafurðum og síðan flutt í ker með hreinu vatni. Vigtun og sýnataka fóru fram á sömu dögum og lýst er fyrir sprautaðan fisk.

## 2.2 Veiðar og sýnataka

Eldfisklakfiskurinn var háfaður úr kerum og aflífaður með höfuðhöggi en eldisseiði sett í yfirskammt af svefnlyfinu TMS (Tricaine methane sulphonate (Pharmaq Ltd) sem leiðir til dauða.

Seiði á leið til sjávar í Elliðaánum voru veidd í seiðagildirur, sjógöngulaxinn ýmist veiddur í gildirur eða net. Silungur og urriði í Elliðavatni voru veiddir í nælonnet með möskvastærð 12 to 50 mm.

Nýrnasýni fyrir ELISA próf og DNA einangrun voru sett í steríla plastpoka og geymd í -20°C frysti. Hrognavökvi var tekinn í sótthreinsuð 10 ml plastglös og geymdur á sama hátt. Nýrnasýni fyrir RNA einangrun og tálknbogásýni fyrir DNA einangrun voru sett beint í glös með RNAlater (Ambion, Texas, USA) og geymd við -80°C fram að notkun. Sýni voru flutt á ís frá tökustað að Keldum.

## 2.3 Bakteríustofnar

*R. salmoninarum*, stofn S-182-90, sem var notaður í rannsókninni var einangruður 1990 úr sýktum laxaseiðum í eldi. Bakteríustofninn var notaður til að prófa eiginleika nýrrar sn-PCR aðferðar sem var þróuð í verkefninu auk þess sem stofninn var notaður sem jákvætt viðmið, og til að framleiða utanfrumuafurðir. Bakteríutegundirnar *Arthrobacter globiformes* og *Williamsia* ssp. voru ræktaðar og prófaðar í snPCR til mats á sértækni þreifaranna og ELSIA.

## 2.4 Einangrun *R. Salmoninarum* og utanfrumuafurðir

### Ræktun á agar

*R. salmoninarum* var einangruð og ræktuð á valæti fyrir kidney disease, SKDM-2, eða á kidney disease medium, KDM-2 (OIE, 2006). Nýrnavefur var hakkaður og þynnur 1/10 í 0.1% peptone saltvatni og spunninn niður við 2200 x g í 20 mín við 4°C. Flotinu var fleygt og botnfallið leyst upp í jöfnum hlutföllum af peptone saltvatni. Lykkjufylli af maukinu var sáð á SKDM agar og haft við 16°C í 16 vikur, skoðað vikulega og niðurstöður skráðar.

Framleiðsla utanfrumuafurða *R. salmoninarum* úr vökvarækt

Einni þyrpingu af *R. salmoninarum* stofni S-182-90 á agarskál var sáð í KDM-2 vökvaeti og ræktað í 12 vikur við 16°C. Þá var vökvaræktin skilin við 8000 rpm, 4°C í 20 mín, flotið hirt og fryst við -20°C. Flotið var þýtt og aðskilið á Amicon Ultra-15 filter, 10K (Millipore) sem skilið var við 4000 x g í 30 mín. Það sem ekki fór gegnum filterinn var hirt og

magn próteina mælt í Nanodrop. Lausnin var einnig greind í Western blot og með silfurlitun. Hreint KDM-2 æti var filtrerað og meðhöndlað á sama hátt og notað til að sprauta viðmiðunarfisk.

### **Mat á bakteríufjölda í lausn**

Bakteríulausn með óþekktum fjölda baktería var þynnt í 10 faldri þynningarröð og 10 dropar hverrar þynningar settir á SKDM agar plötur (10ml hver dropi). Eftir 12 vikur við 16°C, var fjöldi bakteríuþyrpinga talinn til að meta fjölda baktería í upphaflegu lausninni og þéttni rækta mæld við 600 nm í ljósgleypnimæli.

### **Litun með flúrljómadí mótefnum - FAT**

Bakteríuþyrping *R. salmoninarum* er tekin upp af agarskál og og leyst sundur á smásjárgleri í dropa af PBS, dreift og sett í þurrk við 60°C. Þá voru 50 µl af flúrmerktu mótefni gegn bakteríunni (Kirkegaard & Perry laboratories Inc.), þynnt 1/10, sett yfir blettinn og látið standa í 10 mín í lokuðu rakaboxi. Glerið var skolað með PBS og síðan sett í ílát með PBS og haft við væga hreyfingu í 5 mínútur áður en það er tekið upp. Þá var mesta vætan hrist af og glerið látið þorna. Einn dropi af „antifade buffer“ (2ml of glycerol, 80 mg of n-propyl gallate, 800 µl of 1M Tris-HCl, pH 8.0 and 1.2 ml of ddH<sub>2</sub>O) settur yfir sýnið og síðan þekjugler. Sýnið vaer skoðað við 1250 falda mögnun í flúrsmásjá.

## **2.5 Rafdráttur - SDS-PAGE og litanir**

### **SDS-PAGE greining**

Notað var Mini-PROTEAN® II 2-D cell system (Bio-Rad). Sýni voru þynnt 1:25 í vatni og blandað í jöfnum rúmmálum við „reducing sample buffer“ (0.125M Tris, pH 6.8, 0.5% 2-mercaptoethanol and 2% SDS) og hituð í 3 mínútur við 100°C. Sýni voru sett á „stacking gel“ (4.5% acrylamide) og rafdreigin á 12% acrylamide geli. Litað viðmiðunarsýni (PageRuler prestained protein ladder frá Fermentas) var haft með til að meta stærð einstakra banda. Gelin voru lituð með silfurlit eða flutt á (NC) himnu fyrir Western blotting.

### **Silfurlitun**

Silfurlitun var framkvæmd með kitti frá BioRad. Rafdreigin gel voru sett í lausn sem í voru 5ml af Fixative Enhancer Concentrate og 95 ml af 50% methanol-10% acetic acid í 20 mín. Gelin voru þvegin 2 x 10 mín í eimuðu vatni og sett í lausn með 2,5 ml af Silver Complex Solution, 2,5 ml af Reduction Moderator Solution, 2,5 ml af Image Development Reagent, 17,5 ml af eimuðu vatni og 25 ml af Development accelerator reagent til framköllunar. Framköllunin var stöðvuð með því að setja gelin í lausn sem innihélt 5% edikssýru í 15 mín og gelin að lokum þvegin í vatni.

### **Ónæmislitun á NC himnu - Western blotting**

Rafdreigin prótein voru flutt af geli á NC himnu (Immobilon-P transfer membrane, Millipore) í Trans-blot SD, semi-dry transfer cell (Bio-Rad) í 30 mín. við herbergishita eins og lýst er í handbók framleiðanda. Þá var himnan sett í lausn með 0,1% mjólkurdufti í

þvottabuffer (0,1M Tris buffered saline, pH 7,8, með 0,1% Tween®20 (Sigma-Aldrich)) og höfð yfir nótt við 4°C. Þá var hún sett í lausn með 1°mótefnum sem þynnt höfðu verið 1/500 í þvottabuffer og höfð við stofuhita í 1 klst. Prófuð voru eftirfarandi mótefni: 1A1, einstofna mótefni gegn MSA próteininu, gjöf frá Dr. Greg Wiens, Leetown, USA (Wiens & Kaattari, 1991) og B-6-5, fjölstofna mótefni gegn *R. salmoninarum* framleitt í kaninum á Keldum (Gudmundsdóttir et al., 1993). Merkt 2°mótefni, með alkaline phosphatase (Dako) voru fjölstofna mótefni úr kanínu gegn geitar-IgG til að greina B-6-5 og fjölstofna mótefni úr geit gegn músar-IgG til að greina 1A1. Þessi mótefni voru þynnt 1/3000 í þvottabuffer og NC himnan höfð í lausninni í 1 klst við stofuhita. Framkallað var í svokölluðum substrate buffer með 100 µg ml<sup>-1</sup> NBT (nitro blue tetrazolium), 60 µg ml<sup>-1</sup> BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indonylphosphate), 4mM af MgCl<sub>2</sub> og 0,1M ethanolamine-HCl buffer, pH 9,6. Himnurnar voru þvegnar vandlega milli allra skrefa.

## 2.6 ELISA próf

### Undirbúningur sýna

Nýrmasýni voru vegin og þynnt 1/4 í Dulbecco's PBS í sterílum poka og maukuð í Stomacher 80 micro-Biomaster (Seward) hakkara. Maukinu var hellt í tilraunaglas og var 25µl af Tween®20 bætt í glasið fyrir hvern ml mauks. Sýnin voru hituð við 100°C í 15 mín, skilin við 2200g í 20 mín við 4°C og flotið hirt.

### ELISA próf með fjölstofna mótefnum - pELISA

Í pELISA prófinu eru notuð fjölstofna mótefni til að greina mótefnavaka bakteríunnar (Gudmundsdóttir et al., 1993). Notaðar eru 96 brunna plötur (Maxisorp immunoplate, Nunc) sem eru húðaðar með því að setja 100µl af mótefnalausn í hverja holu, grip mótefni framleidd í kaninum gegn mótefnavökum bakteríunnar (B-6-5) eða mótefni úr ómeðhöndlaðri kanínu (N), í styrknum 10mg ml<sup>-1</sup> í 0.05M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 og geymd yfir nótt við 4°C. Plöturnar voru þvegnar 3x á milli allra skrefa í þvottalausn (Dulbecco's PBS, pH 7.2 with 0.7M NaCl and 0.1% Tween®20). Eftir að búið er að skola húðunarmótefnin úr brunnunum er 100µl af sýnum, auk jákvæðra og neikvæðra viðmiðunarsýna, sett í 2 brunna hvert, annan með sértæku mótefni en hinn með kontrólmótefni. Platan er svo sett á hristara sem er stilltur á væga hreyfingu í 2 klst. Eftir þvott (4x) var merktu mótefni bætt í brunnana (100µl) og haft á hristara í 1 klst við stofuhita. Merkta mótefnið er fjölstofna mótefni gegn *R. salmoninarum*, framleitt í geit og merkt með HRP (horse radish peroxidase) (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.). Eftir þvott, var 100µl af hvarfefni bætt í hvern brunn og platan höfð við stofuhita í 15 mín. Hvarfefnið var OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) (Daco) og 8 mg af því voru leyst í 12 ml vatns með 5 µl af 30% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Hvarfið var svo stöðvað með 50 µl af 3N HCl sem bætt var í hvern brunn. OD gildi við 490 nm voru mæld í Victor3 1420 aflestrartæki frá PerkinElmer. Jákvæður aflestur samsvarar 2,3 margfeldi af meðaltals aflestri þriggja neikvæðra sýna.

Hrognavökvi var með höndlaður á ferns konar hátt fyrir ELSIA próf: 1) Þynntur til helminga, og 25µl pr ml Tween-20 bætt í, hafður við 100°C í 15 mín, skilinn við 3000 snún/

mín í 15 mín og flot hirt. 2) Sama meðhöndlun fyrir hrognavökva sem þynntur var 1/4. Hrognavökvi soðinn án Tween-20 og síðan þynntur 3) 1/2 eða 4) 1/4 í PBS með Tween-20.

### **ELISA próf með einstofna mótefnum - mELISA**

Þetta próf var keypt í „kitti“ frá GrupoBios í Chile. Í kittinu voru plötur húðaðar með gripmótefni, auk annarra mótefna og hvarfefna. Þvottur var framkvædur milli allra þrepa. Sýnin voru sett í brunnana í plötunni oghöfð við 37°C í 60 mín. Eftir þvott var merkta mótefnið sett í brunnana og haft á þeim í 30 mín við 37°C. Svo var hvarfefnið, sem var gert úr blöndu efnispátta A og B, blandað saman rétt fyrir notkun, sett í brunnana og platan höfð við stofuhita í 30 mín. Hvarfið var að lokum stöðvað með því að bæta 3N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> í brunnana og OD lesið við 450 nm í Victor3 1420 aflestrartæki frá PerkinElmer. Jákvæð voru þau sýni sem gáfu OD aflestur sem samsvaraði meðaltali fyrir neikvæð sýni að viðbættu 0,260, skv. leiðbeiningum framleiðanda.

## **2.7 DNA einangrun**

### **FTA pappír**

FTA pappír (FTA minicard, Whatman) var notaður til einangrunar á kjarnsýrum samkvæmt leiðbeiningum framleiðandans. Um 50 µl af maukuðu nýrnasýni, þynntu 1/4 í sterílu PBS, eða óþynntur hrognavökvi var sett á FTA pappírinn og þurrkað við stofuhita í a.m.k. 1 klst. Lítil bútur (2mm í þvermál) er stimplaður úr pappírnum með þar til gerðum hníf og settur í PCR glas. Sýnið er þvegið 3 x með 200µl af FTA hreinsivökva og 2 x með 200µl af TE<sup>-1</sup> buffer með 5 mínútna millibili. Sýnið er að lokum þurrkað í 1 klst við stofuhita og þá er það er tilbúið til notkunar í PCR próf.

### **Genomic DNA purification kit – kitt til hreinsunar á gDNA**

Genomic DNA purification kit (Puregene) var notað til einangrunar á gDNA úr nýra og tálknum samkvæmt leiðbeiningum framleiðandans (solid tissue protocol) með nokkrum breytingum. Auðkenningin gDNA er notuð til aðgreiningar frá cDNA, en hið síðara er umritað af RNA sem einangrað er úr lífveru. Kitt, vísar til þess, að allt sem þarf til verksins kemur í einu lagi frá framleiðanda. Í stað proteinase K sem fylgdi kittinu var notað ensímið achromopeptidase (Sigma-Aldrich) sem vitað er að gagnist betur til að rjúfa vegg Gram jákvæðra baktería s.s. *R. salmoninarum* (Magnusson et al., 1994). U.þ.b. 10mg af nýrnavef eða 20mg af tálknavef voru maukuð í glasi í tilheyrandi lausn sem innihélt 100 U (einingar) af achromopeptidase. Eftir 1 klst við 37°C, var RNase A lausn bætt út í glasið og haft við 37°C í 30 mínútur. Svo voru próteinin felld niður með tilheyrandi lausn og spunnin niður. Flotið var sett í nýtt glas sem innihélt isopropanol og lausnin spunnin niður. Flotinu var hent og 70% etanóli bætt í glasið. Spunnið, flotinu hent og 50 µl af DNA leysilausn bætt út í glasið. Magn- og gæðamæling á uppleysta DNA-inu var gerð með mælingu í nanodrop tæki áður en sýnið var sett í -20°C frysti í geymslu.

## **DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)**

DNA var einangrað úr nýrnasýnum (hópur 2c) með DNeasy Blood & Tissue Kit. Um 20 mg sýnis voru sett í 180 µl af ATL buffer og 20 µl af Proteinase K lausn. Sýni voru höfð við 37°C yfir nótt en þá var 50 µl af 4 x lysozyme rof- buffer bætt í lausnina og haft við 37°C í 1 klst. og „vortexerað“ öðru hvoru. Fjórum µl af RNase A er bætt í, vortexerað og haft við stofuhita í 2 mín. Þá eru , 250 µl af AL buffer settir í lausnina og hún höfð við 70°C í 10 mín. Sett í skilvindu í 1 mín á fullum hraða (ávallt var skilið við stofuhita) og flotið fært í nýtt skilvinduglas 250 µl af 95% ethanol og blandað vel. Fært á The QIAamp skilvindusúlu sem sett er á söfnunarglas og skilið við tube 8000 rpm í 1 mín. Súlan var flutt í nýtt safn glas og 500 µl af AW1 buffer bætt á súluna og skilið við 8000 rpm í 1 mín. Súlan var flutt í nýtt safn glas og 500 µl af AW2 buffer bætt á súluna og skilið við fullan hraða í 3 mín. Að lokum var súlan sett í skilvinduglas, 400 µl af 70°C heitum AE buffer bætt í, haft við sth í 1 mín og síðan skilið við 8000 rpm í 1 mín. Vökvinn innihledur nú hreint gDNA sem geyma má við 20°C. Notað var Nanodrop til að mæla styrk kjarnsýrunnar í lausninni.

## **2.8 RNA einangrun og myndun cDNA**

TRIzol (Invitrogen) var notað til að einangra RNA úr *R. salmoninarum* frumum, teknum af SKDM agarrækt og einnig úr hökkuðum nýrnavef. Farið var eftir leiðbeiningum framleiðandans með örlitlum breytingum. Vefjasýni (um 30 mg) var sett í sterílt eppendorfglas sem innihélt 100µl af buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.65) og 80 U af RNase hindra (New England Biolab). Sýnið var maukað í eppendorfglassi með sterílum pinna og 100 U af achromopeptidase bætt í og það sett í hitaskáp í 60 mín við 37°C. Sýnið var tekið úr hitaskápnunum, 900µl af TRIzol bætt í lausnina og hún höfð við stofuhita í 5 mínútur. Til að aðskilja mismunandi fasa í lausninni var 0,2 ml af chloroformi bætt út í lausnina og sýnið hrist af krafti í 15 sekúndur, þá haft við stofuhita í 3 mín og skilið við 12.000 x g í 15 mínútur við 4°C. Efsta lagið var flutt í nýtt eppendorfglas og 0,5 ml af isopropyl alcohol bætt út í lausnina til að fella út RNA. Eftir 10 mín við stofuhita í 10 mín er sýnið skilið niður við 12.000 x g í 10 mínútur við 4°C, flotinu hent og 1 ml af 75% alcohol bætt út í lausnina. Þá er sýnið vortexað og skilið niður við 7.500 x g í 5 mín við 4°C, flotinu hent og RNA botnfallið loftþurrkað í 5 mínútur áður en 50 µl af sterílu vatni er bætt út í lausnina. Magn- og gæðamæling á uppleystu RNA var mælt í nanodrop tæki áður en sýnið var sett til geymslu við -80°. Til RNA einangrunar á bakteríusýnum, sem voru notuð sem jákvæð viðmiðunarsýni í RT-qPCR prófinu, var lykkjufylli af *R. salmoninarum* frumum úr SKDM agarrækt sett í eppendorfglas með 100 µl af buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.65) og 100 U af achromopeptidase. Sýnið var haft við 37°C í 60 mín. Fasaaðskilnaður, RNA niðurfelling, RNA þvottur var framkvæmt á sama hátt og er lýst hér að ofan. Magn- og gæðamæling á kjarnsýrum og próteinum voru framkvæmd í NanoDrop®ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop technologies, Inc.) samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda.

### **cDNA myndun**

Áður en RNA var víxlrtað í cDNA var það meðhöndlað með DNase (Fermentas) skv. leiðbeiningum framleiðanda. Blandað var saman 7 µl af sterílu vatni, 1 µl af RNA (í kringum 1000-1500ng/µl af RNA), 1 U af DNase og 1 µl af 10x reaction buffer. Lausnin var höfð við 37°C í 30 mín. Þá var 1 µl af 25mM EDTA bætt í og glasið sett við 65°C í 10 mín. RevertAid

H minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) var notað til að víxlrítunar sky. leiðbeiningum framleiðandans. Lausnin innihélt 4 µl af DNase meðhöndluðu RNA (um 400-600ng af RNA), 1 µl eða 100pmol af „random“ vísun og 7 µl af sterílu vatni. Lausnin var höfð við 65°C í 5 mín. Þá voru 4 µl af 5x reaction buffer, 0,5 µl af RNase inhibitor, 2 µl (1mM lokastyrkur) af dNTP blöndu og að lokum 1 µl (200 U) af RevertAid™ reverse transcriptase bætt út í lausnina og blandað rólega. Lausnin var höfð við stofuhita (25°C) í 10 mín og 42°C í 60 mínútur. Að lokum var hvarfið stoppað með því að hita lausnina í 70°C í 10 mín.

Til að prófa hvort UNG ensím meðhöndlun kæma að gagni fyrir semi-nested PCR hvarfið voru jákvæð viðmiðunarsýni meðhöndluð með 1 U af UNG ensími og höfð við 37°C í 20 mín áður en þau voru keyrð í hefðbundnu snPCR hvarfi. Í mastermixinu var dTTP bösunum skipt út fyrir dUTP basa. Sýni á FTA pappír voru notaðir fyrir PCR hvarfið. Til að athuga virkni UNG ensímsins, var 0,5 µl af margfölduðu DNA úr jákvæða viðmiðunarsýninu úr dUTP PCR hvarfinu keyrt í nýju snPCR hvarfi sem innihélt UNG ensím og dUTP í stað dTTP. Til samanburðar var snPCR keyrsla með sama efniviði án UNG ensímsins.

## 2.9 TOPO klónun og einangrun á plasmíðum fyrir staðla

### TOPO klónun

Notað var pBAD TOPO® TA Expression kit (Invitrogen). Fyrir TOPO klónunina sjálfa voru PCR afurðir, eða bútar úr msa geni og 16S rRNA geni *R. salmoninarum* bakteríunnar, magnaðar upp með Platinum taq DNA polymerase (Invitrogen) sem býr til óparaðan A-enda á DNA bútanum, sem er nauðsynlegt fyrir klónunina. Lausnin fyrir klónunina innihélt 3 µl af mögnuðum PCR afurðum, 1 µl af saltlausn (1,2 M NaCl og 0,06 M MgCl<sub>2</sub>), 1,5 µl sterílt vatn og 0,5 µl af TOPO vector. Lausnin var höfð við stofuhita í 10 mínútur áður en hún var sett á ís. Til að auðvelda flutning á pBAD TOPO afurð inn í *E. coli* bakteríuna voru „One Shot® TOP10 Chemically component *E. coli*“ bakteríur sem fylgdi kittinu notaðar. *E. coli* bakteríurnar voru teknar úr -80°C frysti og settar beint á ís. Hvarflausninni var svo bætt út í glasið sem innihélt *E. coli* bakteríurnar og haft á ís í 30 mínútur. Bakteríurnar voru fluttar í 42°C í 30 sekúndur til að framkalla hitasjökk og síðan voru þær kældar á ís í 2 mín. Þá var 250 µl af SOC æti bætt út í glasið og það hrist (lárétt) í 1 klukkustund við 37°C. SOC ætinu með bakteríunum var skipt niður í 50 µl, 100 µl og einnig var sáð á LB ætisskálar (sem innihalda 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin) og ræktað við 37°C yfir nótt. Daginn eftir voru 10 kólóníur valdar fyrir hvort markgen og þeim bætt út í 2ml LB-amp æti (sem inniheldur 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin) og ræktað yfir nótt við 37°C. PCR var framkvæmd á kólóníunum til að ganga í skugga um að klónunin hafi heppnast.

### Einangrun á plasmíðum

Qiaprep miniprep kit (Qiagen) var notað til að einangra plasmíð DNA. LB vökvaræktin sem innihélt *E. coli* bakteríurnar var spunnin niður við 3000 rpm í 15 mín til að fella niður bakteríur. Flotinu var hent og botnfallið leyst upp með 250 µl P1 buffer sem innihélt RNase A. Lausnin var flutt í nýtt glas og 250 µl af P2 buffer var bætt út í l og blandað rólega saman uns hún varð þykk og hálfgegnisæ. Síðan var 350 µl af N3 buffer bætt í og og blandað hratt og vel til að koma í veg fyrir útfellingar. Lausnin var spunnin niður við

5000 rpm í 10 mín og við það myndast hvítt botnfall. Flotið var sett á Qiaprep súlu í safnglasi og spunnið við 5000 rpm í 1 mín. Vökvanum var fleygt og 750 µl af PE buffer bætt á súluna og spunnið aftur við 5000 rpm í 1 mínútu. Aftur var vökvanum fleygt og súlan spunnin til að losa hana við allan auka vökva í filternum. Súlan var svo flutt í nýtt safnglas og 50 µl af EB buffer bætt á súluna og látið standa í 1 mínútu áður en súlan var spunnin niður í 1 mín.. Magn- og gæðamæling á uppleystu DNA var mælt í nanodrop og sýnið sett í -20°C frysti í geymslu.

## 2.10 PCR aðferðir

Alls voru prófaðar sex PCR aðferðir, en tvær þeirra hannaðar frá grunni í verkefninu. Í töflu 1 eru allar aðferðirnar og helstu upplýsingar um þær settar fram.

### Semi-nested PCR - snPCR

Þrjár vísar (tafla 1) voru hannaðir fyrir snPCR prófið sem fer fram í tveimur hvörfum í einu PCR glasi til að magna upp bót úr msa geni *R. Salmoninarum* (tafla 2). Vísarnir voru hannaðir út frá birtri basaröð úr msa1 geni (GenBank accession number: AY986794.1) með aðstoð Primer3 forritsins. Tveir vísar, For\_msa og Rev\_msa, magna upp fyrri afurð að stærð 270 basapör. Þriðji vísirinn, nRev\_msa, magnar upp seinni afurðina að stærð 199 basapör með aðstoð For\_msa vísisins. Bræðslumark vísanna er 57,3°C fyrir For\_msa, 55,3°C fyrir Rev\_msa og 50,4°C fyrir nRev\_msa. Ensímið platinum taq polymerase (Invitrogen) er með s.k., „hot-start enzyme“ kerfi sem útheimtir 10 mín upphafs skref í PCR prógramminu við 94°C, til að losa mótefni frá ensíminu. Sem DNA mót í PCR hvarfið var annaðhvort notað 1 µl af 10<sup>-1</sup> þynntu DNA einangrað með hreinsikitti (Puregene) eða bútur úr FTA pappírnum sem innihélt sýnið sem verið var að prófa. Hvarflausnin, sem var í heildina 25 µl, innihélt 0,24mM af hverjum basa, 2mM af MgCl<sub>2</sub>, 24mM af Tris-HCl (pH8,4), 60mM af KCl, 1,6 µM af For\_msa og nRev\_msa vísnum, 0,8 µM af Rev\_msa vísinum og 0,625 U af platinum taq DNA polymerase. PCR hvarfið var framkvæmt í Peltier thermal cycler (PTC-200) tæki frá MJ research.

### Nested-PCR - nPCR

Í þessu prófi próf eru tvö hvörf í aðskildum glösnum (tafla 2), sitt með hvoru vísaparinu (tafla 1). Fyrri vísaparið magnar upp 383 basapara afurð sem er notuð sem DNA mót í seinna hvarfinu. Seinna vísaparið magnar upp afurð að stærð 320 basapör, innan fyrri afurðar (Chase et al., 1998). Í fyrri hvarfinu er DNA mót þar sem annað hvort var notað 1 µl af 10<sup>-1</sup> þynntu DNA einangruðu úr sýni með hreinsikitti (Puregene) eða bútur úr FTA pappírnum sem innihélt sýnið sem verið var að prófa. Eftir fyrri mögnun er 1 µl af afurðinni flutt í nýtt glas með nýju mastermixi sem inniheldur seinna vísaparið. Hvarflausnin, sem var í heildina 25 µl, innihélt 0,2mM af hverjum basa, 2mM af MgCl<sub>2</sub>, 20mM af Tris-HCl (pH8,4), 50mM af KCl, 1 µM af báðum vísnum og 0,625 U af platinum taq DNA polymerase. PCR hvarfið var framkvæmt í Peltier thermal cycler (PTC-200) tæki frá MJ research.

### Rafdráttur og túlkun niðurstaðna fyrir snPCR og nPCR

Rafdráttur á afurðum snPCR og nPCR voru framkvæmd á 2% agarose geli (Saekem) sem innihélt ethidium bromide (Sigma). Eftir rafdrátt voru afurðir skoðaðar í UV ljósi og

myndaðar. Stærðir afurða voru ákvarðaðar með samanburði við 1kb DNA standard (Invitrogen) eða GeneRuler 100bp DNA ladder (Fermentas).

Í samnburðarprófunum var hvert sýni var prófað tvisvar í hvoru PCR prófi. Ef bæði hvörfín í sama prófi voru jákvæð var sýnið flokkað sem slíkt og neikvætt væru bæði hvörf neikvæð. Væri annað hvarfið jákvætt en hitt neikvætt, var sýnið skráð sem semi-jákvætt ((+)). Bæði í snPCR og nPCR, hvort sem DNA var einangrað á FTA eða með DNA kitti, voru semi-jákvæð sýni endurtekin og nú gerð 4 hvörf fyrir hvert sýni. Ef eitt eða fleiri voru jákvæð, flokkaðist sýnið sem jákvætt. Tvö jákvæð og 2 neikvæð viðmiðunarsýni voru í hverri keyrslu. Neikvæðu sýnin voru sterilt eimað vatn og jákvæð sýni voru ýmist meðhöndlaður sýktur vefur eða hreinrækt af *R. salmoninarum*.

### qPCR

qPCR, þ.e. magnbundið (quantitative), var notað til að meta magn bæði msa og 16S rRNA genanna (gDNA). Til að magna upp msa genið voru notaðir vísar og þreifari (Chase et al. 2006) en til að magna upp 16S rRNA genið voru vísar og þreifari hannaðir með aðstoð Primer3 forritsins út frá birtri basaröð af 16S rRNA geninu (GenBank accession number: AF180950.1). qPCR var framkvæmt á gDNA úr nýrum fiskanna sem hafði verið einangrað með DNA kitti (Puregene) og þynnt  $10^{-2}$  áður en þau voru sett í hvarfið. Í hvarfínu, sem var í heildina 12  $\mu$ l, var notað Maxima probe/rox qPCR mastermix frá Fermentas (2x). Hvarfið innihélt 5  $\mu$ l af þynntu gDNA auk 0,9  $\mu$ M af vísunum og 0,25  $\mu$ M af þreifaranum auk mastermixins. PCR hvarfið var framkvæmt samkvæmt Chase et al. 2006 í StepOnePlus Real-

time PCR system, thermal cycling block frá Applied Biosystem. Þröskuldurinn fyrir jákvæð sýni var á hring 38 í PCR prógramminu. Neikvæðu sýnin voru sterilt eimað vatn og jákvæð sýni voru ýmist meðhöndlaður sýktur vefur eða bakteríurækt.

### RT-qPCR

RT-qPCR var notað við mælingar á nýrnasýnum eingöngu. RNA var einangrað og víxlritað í cDNA. Skammstöfunun RT vísar til þessarar víxlritunar frá RNA til DNA, þ.e. reverse transcription (RT). Seinna skrefið er eins og lýst er hér að ofan í kaflanum um qPCR. Notaðir eru 5 $\mu$ l af óþynntu cDNA í stað hundraðfaldrar þynningar á gDNA.

Í öllum prófum qPCR og RT-qPCR voru ávallt 2 jákvæð og 2 neikvæð viðmiðunarsýni. Neikvæðu sýnin voru sterilt eimað vatn og jákvæð sýni voru ýmist meðhöndlaður sýktur vefur eða hreinrækt af *R. salmoninarum*. Til að fá efnivið í staðalkúrfur fyrir qPCR og RT-qPCR voru viðkomandi gen, msa og 16S rRNA úr *R. salmoninarum*, klónuð inn í *E. coli* vektora með TOPO klónun og einangruð. Raðþynningar frá 5 til 50.000 eintaka viðkomandi gens voru útbúnar og notaðar í staðalinn.

Tafla 1.

Listi yfir alla þrímera og próba sem voru notaðir í verkefninu. Tilgreind er PCR aðferð, gen sem leitað er að (target gene), nöfn þeirra, staðsetningu (location), röð basa (sequence) og höfunda greina sem vísað er í (reference).

PCR methods	Target gene	Name	Location	Sequence	Reference
<b>Semi-nested PCR</b>	msa				This study
Forward primer		For_msa	996-1015	5'-AGATGGAGCAACTCCGGTTA-3'	
Reverse primer		Rev_msa	1247-1266	5'-GGGATTACCAAAAGCAACGA-3'	
Nested reverse primer		nRev_msa	1175-1191	5'-TCTCTCAACGCCAATAC-3'	
<b>Nested PCR</b>	msa				Chase et al 1998
Forward primer		P3	75-93	5'-AGCTTCGCAAGGTGAAGGG-3'	
Reverse primer		M21	438-458	5'-GCAACAGGTTTATTTGCCGGG-3'	
Nested forward primer		P4	95-119	5'-ATTCTTCCACTTCAACAGTACAAGG-3'	
Nested reverse primer		M38	394-415	5'-CATTATCGTTACACCCGAAACC-3'	
<b>qPCR and RT-qPCR</b>	16S rRNA				This study
Forward primer		Left16S	976-997	5'-ACCAAGGCTTGACATGGATTAG-3'	
Reverse primer		Right16S	1028-1046	5'-GCACCACCTGTGAACCAAC-3'	
Hydrolysis probe		Hyb16S	1003-1027	VIC-5'-TGCAGAAATGTACTCCCCTTTTGG-3'-TAMRA	
<b>qPCR and RT-qPCR</b>	msa				Chase et al 2006
Forward primer		RS1238	968-989	5'-GTGACCAACACCCAGATATCCA-3'	
Reverse primer		RS1307	1018-1037	5'-TCGCCAGACCACCATTTACC-3'	
Hydrolysis probe		RS1262	992-1007	FAM-5'-CACCAAGTGGAGCAAC-3'-NFQ-MGB	
<b>qPCR</b>	msa				Powell et al 2005
Forward primer		250F	142-165	5'-CAACAGGGTGGTTATTTCTGCTTTC-3'	
Reverse primer		344R	215-236	5'-CTATAAGAGCCACCAAGCTGCAA-3'	
Hydrolysis probe		300T	192-211	FAM-5'-CTCCAGCGCCGAGGAGGAC-3'-TAMRA	
<b>qPCR</b>	ABC transporter ATPase gene				Rhodes et al 2006
Forward primer		ABCtransfor2		5'-CTAAACGATTTCCCGTCAA-3'	
Reverse primer		ABCtransrev2		5'-GATTTTGCCTGCTGGTATTTCC-3'	
Hydrolysis probe		ABCtrans		FAM-5'-AAGCGCCAGCAGTCGACGGC-3'-TAMRA	

Tafla 2.

Prógrömm fyrir snPCR og nPCR. Tími og hitastig fyrir eðlissviptingu (denaturing), tengingu (annealing) og lengingu (elongation) sýna ferlin.

snPCR			nPCR		
1. Denaturing	94°C	10 min	1. Denaturing	94°C	10 min
	+			+	
2. Denaturing	94°C	30 sec	2. Denaturing	94°C	30 sec
3. Annealing	61°C	2 min	3. Annealing	60°C	30 sec
	(↓0,5°C for each cycle)		4. Elongation	72°C	1 min
4. Elongation	72°C	30 sec		+	
	+		5. Elongation	72°C	10 min
5. Denaturing	94°C	30 sec		Skref 2-4 endurtekin 29 sinnum	
6. Annealing	55°C	2 min		Fyrri og seinna hvarf eru alveg eins	
7. Elongation	72°C	30 sec			
	+				
8. Denaturing	94°C	15 sec			
9. Annealing	45°C	15 sec			
10. Elongation	72°C	15 sec			
	+				
11. Elongation	72°C	10 min			
	Skref 2-4 endurtekin 11 sinnum				
	Skref 5-7 endurtekin 13 sinnum				

## 2.11 Tölfræði

Kj-í-kvaðrat, var notað til tölfræðilegs samanburðar (homogeneity or multinomial distribution) á útkomum sem fengust með mismunandi aðferðum í sýnahópum 1 og 2. Microsoft Office Excel 2007 var notað við ANOVA samanburð á meðaltölum úr hópi 3.  $P < 0.05$  var viðmiðnargildi fyrir marktækni.

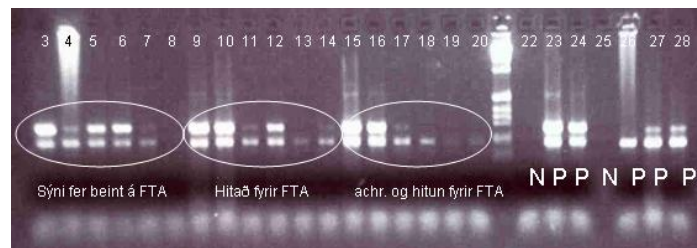
### 3. Niðurstöður

#### 3.1. Þróun aðferða

##### Einangrun gDNA

Prófaðar voru ýmsar aðferðir við meðhöndlun á nýrnasýnum. Meginlínur voru tvær. Annars vegar að nota hefðbundið DNA kitt og hins vegar að prófa FTA pappír til einangrunar. DNA sem einangrað er úr vef eða rækt er aukennt sem gDNA (g: genomic) til aðgreiningar frá cDNA, sem er víxlritað af RNA bútum, sem aftur hafa verið eru einangraðir úr sýnum. Gerður var ítarlegar samanburður á viðbótarskrefum til að endurbæta aðferðir til einangrunar gDNA. Hér var um að ræða hitun og tvenns lags ensímmeðhöndlun, eða blöndu af þessum skrefum. Megin niðurstaðan varð sú, að FTA papírinn tekur fram hefðbundnu DNA hreinsunarkitti (tafla 3) og ekki er til bóta að bæta skrefum með hita- eða ensímmeðhöndlun við lýsingu framleiðanda, mynd 1.

Hægt er að bæta einangrun með kitti með því að nota achromopeptidasa í stað proteinasa K. Þetta er sýnt á mynd 2, þar sem árangur af achromopeptidasameðhöndlun er sýndur og borinn saman við hitameðhöndlun. Achromopeptidasi var prófaður í mismunandi styrk til að finna heppilegasta ensímsinstyrkinn, sem reyndist vera 100 U, mynd 3.



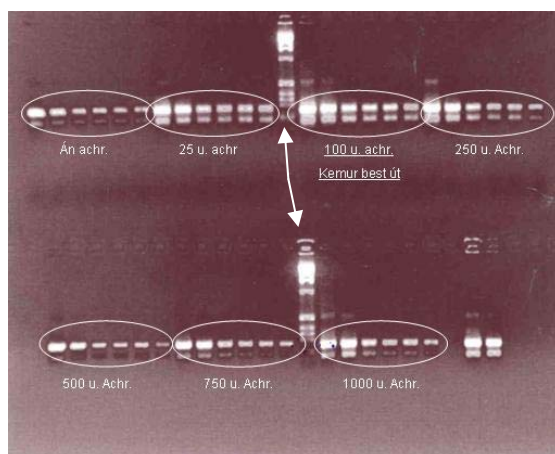
Mynd 1.

Rafdráttargel með snPCR afurðum. Nýrnahakk, ýmist óhitað eða hitað (100°C í 20 mín) var sett á FTA pappír í þremur mismunandi þynningum og hvert sýni tvítekið. N: neikvætt viðmiðunarsýni; P: jákvætt viðmiðunarsýni.



Mynd 2.

Rafdráttargel með snPCR afurðum úr nýrnasýnum þar sem DNA var einangrað með DNA-kitti að viðbættu skrefi með achromopeptidasa (DNA kit sýni) og sýni sem voru einnig hituð við 100°C í 20 mín fyrir PCR keyrsluna (hitunarsýni).



Mynd 3.

Mismunandi þynningar af achromopeptidasa notaðar til að meðhöndla sama sýnið fyrir snPCR. 100 U gefa besta útkomu. Örin bendir á stærðarviðmið (ladder).

Þegar búið var að besta báðar aðferðir, var þeim beitt við einangrun gDNA úr nýrna-, tálkna- og hrognavökvasýnum í hópi 1. Í töflu 3, sést að einangrun á FTA pappír er marktækt betri kostur en að nota hefðbundið DNA-kitt með viðbættu achromodasa skrefi. Þeirri aðferð var því beitt við áframhaldandi rannsóknir.

Tafla 3.

40 nýrnasýni úr sýktum hópi klaklaxa. Samanburður tveggja aðferða til gDNA hreinsunar, FTA og DNA kitt og tvenns lags PCR prófa, snPCR og nPCR.

DNA isolation	FTA		DNA kit	
	snPCR	nPCR	snPCR	nPCR
N=40				
Fjöldi +	17	18	12	12
Fjöldi -	23	22	28	28
% +.	42.5%	45%	30%	30%

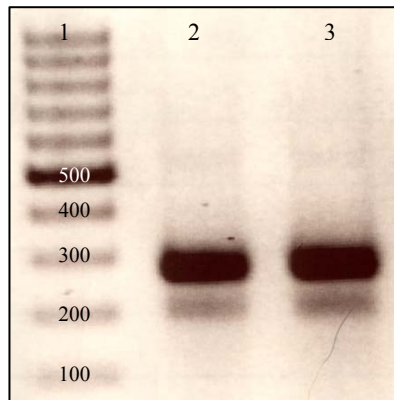
### Einangrun RNA

TRIzol einangrun, að viðbættu achromopeptidasa skrefi, reyndist best til einangrunar á RNA. Eins og fram kom í framvinduskýrslu til sjóðsins 2008 voru prófaðar 3 aðrar aðferðir með ýmsum útfærslum, en ofanskráð aðferð gaf besta raun. Mælingar á RNA með Nano-drop aðferð sýndu að það einangruðust 400-2200 ng/μL RNA úr nýrnasýnum en 10-100 ng/ μL úr bakteríusýnum. Ekki var bein samsvörun milli RNA magns og niðurstaðna í PCR mælingum.

### Þróun snPCR

Forsenda fyrir snPCR er að tvö hvörf verði í einu glasi. Hannaðir voru 3 hitastýrðir vísar og böndin sem þeir mynda eru 270 og 199 basapör að stærð, mynd 4. Raðgreining neðra bandsins sýnir að röðin samsvarar fullkomlega röð úr msa geni bakteríunnar.

Til að meta greiningarmörkin var hreinsuðu DNA úr *R. salmoninarum* bætt í ósýktan nýrnavef til að líkja eftir raunverulegum aðstæðum. Greiningarmörk snPCR og nPCR voru 5-10 bakteríur í hvarfi. Þegar þessu aðferðum var beitt á sýni var næmi þeirra einnig mjög svipað, tafla 3. Hið sama kom í ljós með hrognavökva.



Mynd 4.

Tvær afurðir snPCR, í tveimur sýnum (vasar 2 og 3) úr bakteríufrumum, 270 og 199 basapör að stærð. Viðmiðunarlausn til stærðarákvörðunar, standard, er í vasa 1.

### qPCR og RT-qPCR

qPCR aðferð var beitt til að greina búta úr genum (gDNA) sem skrá fyrir msa og 16S rRNA genum. Í fyrra tilfellinu voru vísarnir áður birtir (Chase et al., 2006) en í hinu síðara voru þeir hannaðir fyrir verkefnið með aðstoð tölvuprógramms. Vísarnir fyrir msa genið greindu 30% sýna jákvæð en 22.5%, væru 16S rRNA vísarnir notaðir, tafla 4. Af þeim 14 sýnum sem voru jákvæð samanlagt, voru 8 (57,1%) jákvæð með báðum aðferðum.

Tafla 4.

Samanburður á qPCR og RT-qPCR til greiningar á msa og 16S rRNA genum.

	msa gen		16S rRNA gen	
n=40	qPCR	RT-qPCR	qPCR	RT-qPCR
+	12	10	9	13
+/-	3	8	2	0
-	25	22	29	28
% jákv.	30%	25%	22.5%	32.5%

Sömu vísapör voru notuð til að greina cDNA sem var umritað úr RNA er einangrað hafði verið úr sömu sýnum (RT-qPCR). Þá voru færri sýni jákvæð fyrir msa kjarnsýrubútum, en munurinn var ekki marktækur. Hins vegar greindust fleiri 16S rRNA sýni jákvæð með RT-qPCR aðferðinni og þar var um marktækan mun að ræða. Öll ofangreind sýni voru með pELISA gildi frá OD 1,000 og upp úr. Tölfræðilegur samanburður niðurstaðna fyrir qPCR og RT-qPCR, sem greina msa genið, við snPCR og nPCR greingarniðurstöður, sýndi marktækt fleiri jákvæð sýni greind með síðarnefndu aðferðunum ( $p < 0,05$ ).

### **3.2 Niðurstöður prófana á sýnum úr ýmsum hópum laxfiska**

#### **Hópur 1a. Klaklax í eldi**

Allar niðurstöður fyrir þennan hóp eru sýndar á mynd 5. Sýndar eru niðurstöður fyrir nýrna-, hrognavökva- og tálknasýni, úr 6 mismunandi PCR prófum og fyrir mismunandi aðferðir við kjarnsýruhreinsun, auk tvenns lags ELISA mælinga.

Niðurstöður fyrir nýrnasýni gáfu mestar upplýsingar. Af PCR aðferðunum gáfu snPCR og nPCR á nýrnasýnum flest jákvæð svör eða 17 og 18, þegar FTA var notað til DNA einangrunar. Aðferðunum bar mjög vel saman, þ.e. það voru sömu sýnin sem voru jákvæð og eitt að auki í n-PCR. Hrognavökvi sömu fiska í sömu prófum var jákvæður fyrir 4 þessara einstaklinga og einn að auki. Eitt tálknasýni var jákvætt í snPCR og tvö í nPCR en þau voru bæði jákvæð með fjölda annarra aðferða í bæði hrognavökva- og nýrnasýnum.

pELISA á nýrnasýnum greindi flesta jákvæða einstaklinga eða 26 (65,0%) en einungis 17,5% voru jákvæð, þegar notað var mELISA kitt frá BiosChile, sem er mjög marktækt. Munurinn milli sn-PCR og nPCR og pELISA var ekki marktækur í kjikvaðrat prófi þegar FTA var notað til einangrunar. Í töflu 3 sést hvernig fjöldi jákvæðra sýna eykst bæði í snPCR og nPCR þegar FTA einangrun kemur í stað DNA kitts. Munurinn er marktækur fyrir nPCR og við marktækni fyrir snPCR. Athyglisvert er að ekkert sýni, þar sem notuð er DNA-kitt einangrun, er með neikvæðan pELISA aflestur meðan tvö sýni (nr. 9 og 10) þar sem FTA er notað til einangrunar eru jákvæð í snPCR og neikvæð í pELISA.



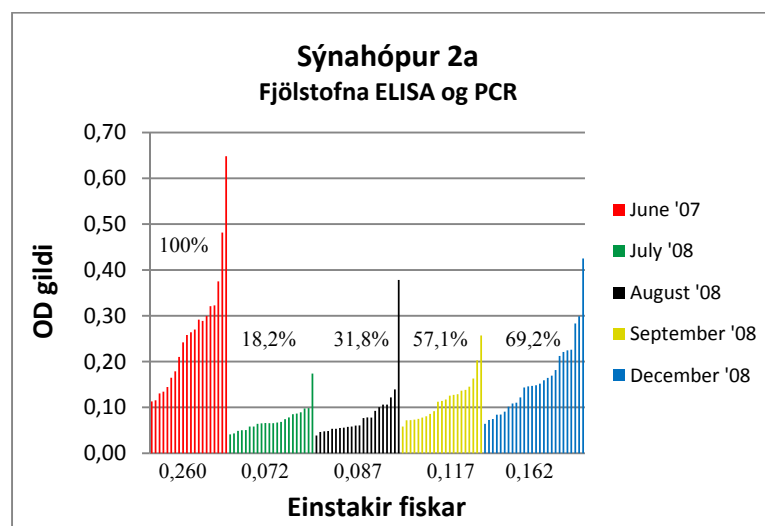
Prófaðar voru fjórar aðferðir til að undirbúa hrognavökvasýni fyrir pELISA-próf eins og fram kom í framhaldsskýrslu til sjóðsins 2008, en einungis sú þeirra sem gaf besta raun er birt í lokaskýrslu. Þar fór saman hæstur aflestur og minnstur bakgrunnur. Einungis 1 sýni var jákvætt með þessari aðferð eins og sést í mynd 5 og var jafnframt eina sýnið sem var jákvætt í öllum sýnum með öllum aðferðum.

### ELISA sýni sett í PCR, skv. aðferðalýsingu frá danskri rannsóknarstofu

Í verkþætti 4 voru gerðar snPCR og nPCR greiningar á ELISA sýnum úr safni fisksjúkdómadeildar. Kjarnsýrueinangrun var ýmist gerð með DNA-kitti eða á FTA pappír. Ýmis meðhöndlun var prófuð við kjarnsýruhreinsun. Mikið ósamræmi kom fram milli aðferðanna innbyrðis og endurteknar mælingar sýna ekki alltaf sömu niðurstöðu eins og fram kom í tilraunaskýrslunni 2008.

### Hópur 2a. Villtur lax. Sjógönguseiði og göngulax.

Sjógönguseiðasýnin, tekin í júní 2007, voru jákvæð fyrir mótetnavökum *R. salmoninarum* í pELISA, mynd 6. Meðaltals gleypnigildið var 0,260. Ári síðar, eða í fyrstu sýnatöku á göngulaxi í júlí 2008, svöruðu 18,2% fiska jákvætt í pELISA og meðaltals gleypnigildið var 0,072. Í ágúst sama ár voru 31,8% jákvæðir, og meðaltalsgleypnigildi 0,087. Í september voru 57,1% jákvæðir, meðaltalið 0,117 og við síðust mælingu í desember voru 69,2% jákvæðir og meðaltalsgleypnigildi 0,162. Öll sýni voru prófuð í snPCR og nPCR, nema sjógönguseiðin sem voru eingöngu prófuð í snPCR. Öll sýni voru neikvæð í PCR. pELISA aðferðin greindi marktækt fleiri jákvæð sýni en PCR aðferðirnar (Kí-kvaðrat próf,  $p < 0,05$ ). Marktækt fleiri jákvæð sýni voru í sjógönguseiðahópnum en göngulaxahópnum ( $0,001 < p < 0,01$ ). Fjöldi jákvæðra sýna í göngulaxi júlí og ágúst var marktækt lægri en í göngulaxhópi í desember ( $p < 0,01$ ).



Mynd 6.

Hópur 2a. OD gildi við 492 nm í pELISA á nýrnasýnum úr sjógönguseiðum (júní'07) og 4 hópum göngulaxa 2008. Hver súla táknar einn fisk og er raðað eftir hækkandi OD gildi fyrir hvern hóp um sig. Meðaltals gleypnigildi eru sýnd undir hverjum hópi. Einnig er hundraðshluti jákvæðra sýna í hverjum hópi sýndur fyrir ofan súlurnar.

## **Hópur 2b. Bleikja og urriði í Elliðavatni 2008**

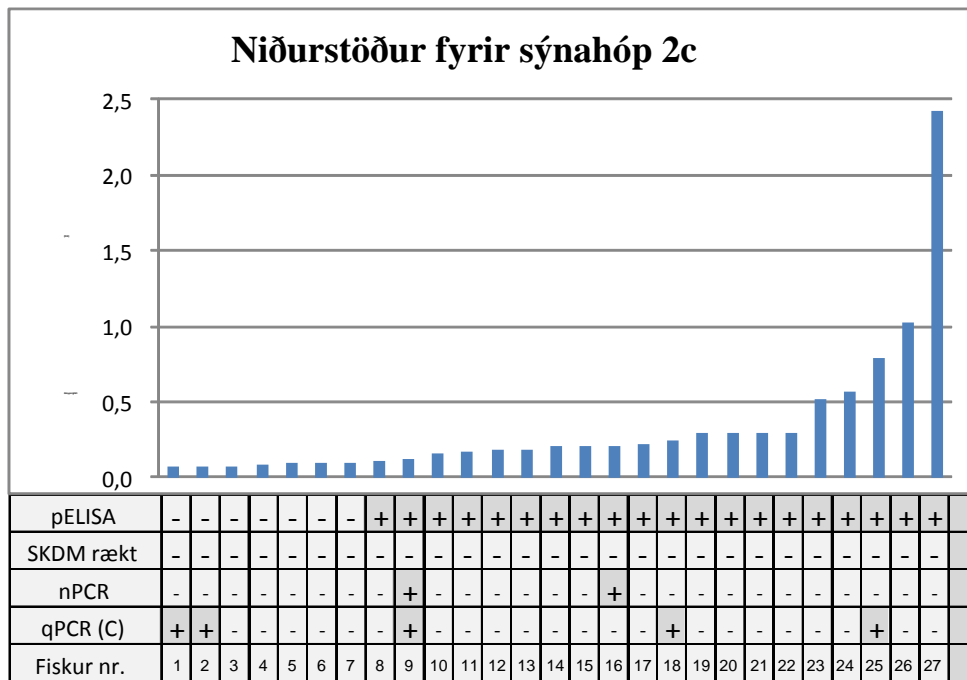
Í bleikjusýnunum voru meðaltals- gleypnigildi 0,485 og 89% sýnanna voru jákvæð í pELISA. Urriðasýnin höfðu meðaltalsgleypnigildi 0,514 og 98% sýnanna voru jákvæð í pELISA, mynd 7. Öll sýnin voru prófuð bæði í snPCR og nPCR. Öll sýnin voru neikvæð í snPCR en 2 bleikjusýni (11%) og 3 urriðasýni (5%) voru jákvæð í nPCR. Þau bleikjusýni sem voru jákvæð í nPCR höfðu gleypnigildin 0,229 og 0,510. Þau urriðasýni sem voru jákvæð í nPCR höfðu gleypnigildin 0,209, 0,281 og 1,528. pELISA greindi marktækt fleiri jákvæð sýni en PCR aðferðirnar ( $p < 0,001$ ) en ekki var marktækur munur milli PCR aðferðanna. Ekki var marktækur munur á milli fisktegundanna með tilliti til niðurstaðna í pELISA eða PCR aðferðanna.

Mynd 7.

Sýndar eru pELISA og nPCR niðurstöður fyrir bleikju og urriða í Elliðavatni 2008. Hver súla táknar einn fisk og raðað er eftir hækkandi gildi fyrir hvora tegund um sig. Sýni með jákvætt nPCR eru sýnd með örvum. Hlutfall jákvæðra sýna í pELISA og meðaltals gleypnigildi eru sýnd fyrir neðan grafíð.

## **Hópur 2c. Urriði í Elliðavatni 2009**

Árið 2009 voru 74% sýna úr urriða úr Elliðavatni jákvæð fyrir mótefnavaka *R. salmoninarum* í pELISA, mynd 8. Meðaltals gleypnigildið var 0,632. Öll sýnin voru neikvæð í ræktun á SKDM. Aðeins 2 sýni (7,1%) voru jákvæð í nPCR. Í qPCR skv. Chase et al. (2006) voru 5 sýni jákvæð fyrir bakteríunni eða 17,8%. Marktækt fleiri sýni voru jákvæð í pELISA samanborið við allar hinar aðferðir ( $p < 0,001$ ). pELISA, nPCR og qPCR greindu sýni númer 9 jákvætt og 5 sýni voru neikvæð í þeim öllum. Samræmi á milli gleypnigildis í pELISA og Ct gildis (Cycle threshold) í qPCR var ekki fyrir hendi, eða 0,177 (Ct: 34,2), 0,205 (Ct: 32,7), 0,305 (Ct: 33,1), 0,482 (Ct: 34,4) og 1,357 (Ct: 37,99) fyrir sýnin 1, 2, 9, 16 og 18. Hlutfall jákvæðra sýna í pELISA hjá urriðasýnunum í Elliðavatni breyttist marktækt á milli ára ( $p < 0,05$ ) eins og sést þegar sýnahópar 2b (2008) og 2c (2009) er bornir saman.



Mynd 8.

Gleypnigildi fyrir pELISA er sýnd á grafinu og hver súla táknar einn fisk. Niðurstöður fyrir nPCR, qPCR (Chase et al., 2006) og SKDM ræktun eru sýndar í töflu fyrir neðan og jákvæð sýni auðkennd með lit.

### Sýni úr fórum Fisksjúkdómadeildar

Unnið var að þróun og prófun aðferða mest allan verkefnistímann. Auk þeirra sýna sem var safnað sérstaklega fyrir verkefnið, voru notuð eldri sýni úr fórum Fisksjúkdómadeildar. Hér var um að ræða nýrnasýni send inn vegna sjúkdómsrannsókna og sérstakra verkefna. Þessi sýni komu að góðum notum við aðferðaþróun og staðfest var að gDNA varðveitist í nýrnavef. Sýni sem höfðu verið hökkuð fyrir frystingu voru mun síðri efniviður. Í töflu 8 eru sýndar niðurstöður fyrir nýrnabita sem höfðu verið tæp 15 ár í frysti við -20°C. Þeir voru teknir vegna s.k. Vatnaverkefnis (Jónsdóttir et al., 1998). Í því verkefni var pELISA notuð til skimunar. Niðurstöður þeirrar rannsóknar komu mjög á óvart á sínum tíma, menn áttu ekki von á að *R. salmoninarum* væru svo algeng í vistkerfinu, en PCR niðurstöðurnar staðfesta tilvist nýrnaveikibakteríunnar í þessum vatnakerfum þótt hlutfall jákvæðra með þeirri aðferð sé ekki jafn hátt og í pELISA prófum. Þetta samræmist niðurstöðum úr Elliðavatni 2008 og 2009.

Tafla 8. pELISA og nPCR á nýrnasýnum teknum vegna Vatnaverkefnisins

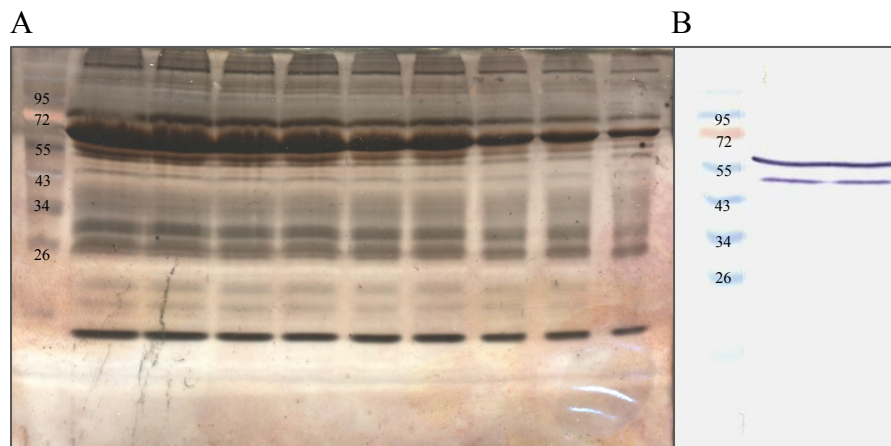
Mývatn			Lagarfljót		
nPCR	ELISA Jákv.	ELISA Neikv.	nPCR	ELISA Jákv.	ELISA Neikv.
Jákv.	3	4	Jákv.	0	4
Neikv.	1	2	Neikv.	11	4
Ekki gert	8	7	Ekki gert	8	1

### 3.4 Utanfrumuafurðir *Renibacterium salmoninarum*: greining og afdrif í heilbrigðum laxaseiðum

#### Greining

Utanfrumuafurðir, hreinsaðar úr floti af vökvarækt, voru rafdregnar í geli silfurlitaðar. Á mynd 14 (ritgerð) sjást helstu prótein í afurðinni. „Þykkasta“ bandið er í kringum 59 kDa að stærð og bandasettið (duplex) þar fyrir neðan áætlast 51 og 48 kDa.

Mórefnalitun á þrykki, með einstofna mótefnum gegn MSA próteininu, greinir bönd af stærðunum 58 og 50 kDa.



Mynd 9. Silfurlitun utanfrumuafurða í minnkandi styrk (A) og western blot (B) með einstofna mótefnum gegn *R. salmoninarum*

#### Afdrif tilraunafisks

Tilraunin stóð yfir í 42 daga. Enginn tilraunafiskanna sýndi ytri merki um sjúkleika og dauði var enginn. Mótefnavakar mældust í pELISA og mELISA prófum í nýrnasýnum úr fiski sem var sprautaður með afurðunum, en fiskur sem var baðaður í þeim var neikvæður í báðum prófum.

#### pELISA á seiðum sem fengu utanfrumuafurðir í kviðarhol

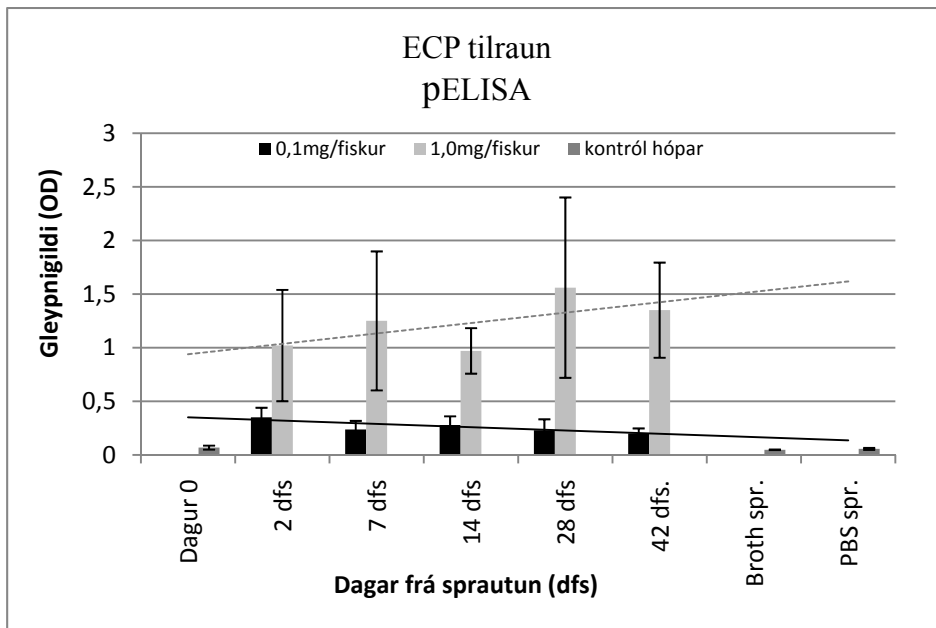
Nýrnasýni úr fiski sem fékk ECP í kviðarhol, voru mæld í pELISA, sjá mynd 10 og töflu 6. Öll samanburðarsýni, þ.e. úr ómeðhöndluðum fiski í upphafi tilraunar (0 fiskur) og fiski sem var sprautaður með PBS dúa eða KDM æti, voru neikvæð. Magnbundinn munur var verulegur á öllum tímapunktum, fyrir seiði sem fengu annars vegar 0,1 en hins vegar 1,0 mg afurðanna í kviðarhol.

Mæligildi, á hverjum tímapunkti, fyrir þá sem fengu hærri skammtinn, dreifðust á vítt svið eins og fram kemur á mynd 10 og því var staðalfrávik meðaltala mjög hátt.

Strax 2 dögum eftir sprautun í kviðarhol voru nýrnasýni orðin jákvæð í pELISA. Gildi aðhvarfslínu fyrir fisk sem fékk 1,0 mg af ECP var 0.097, sem sýnir svolitla hækkun á tímabilinu, en breytingin var ekki marktæk í ANOVA greiningu. Aðhvarfslína fyrir lægri skammtinn reyndist vera -0.031, sem sýnir lækkun gilda með tíma, en þessi breyting er heldur ekki marktæk í ANOVA greiningu. Í töflu 6, þar sem ELISA niðurstöður fyrir fisk sem fékk minni skammtinn eru settar fram, sést að það er einungis 2 d eftir sprautun sem allir fiskar eru jákvæðir. Eftir það eru 1-3 fiskar af 8 neikvæðir á hverjum tímapunkti og meðaltalið fer lækkandi.

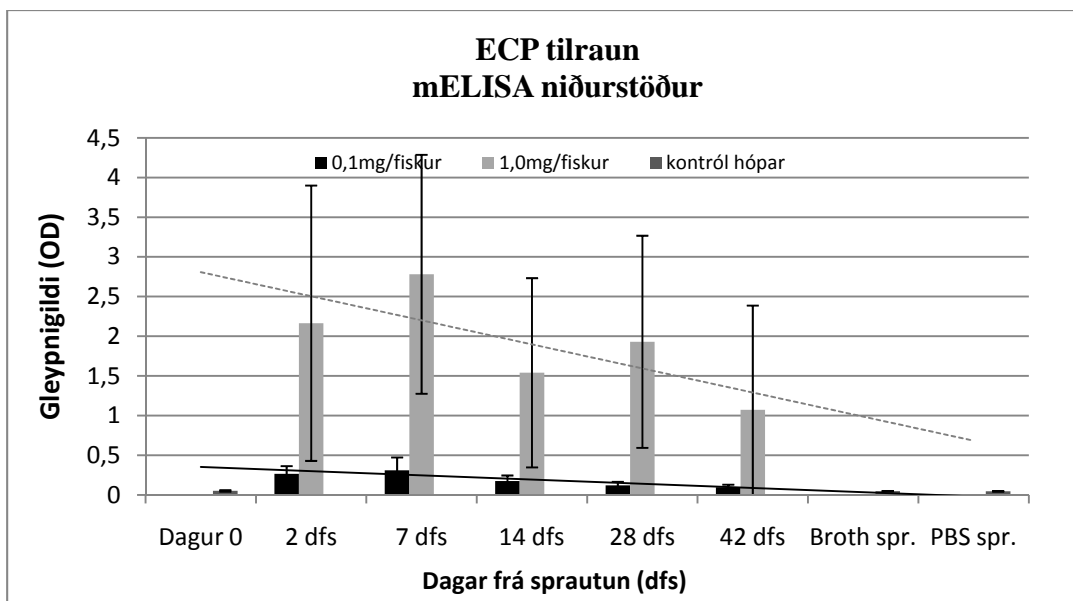
### mELISA á seiðum sem fengu utanfrumuafurðir í kviðarhol

Öll sýni úr fiski sem fékk utanfrumuafurðir í kviðarhol, voru jákvæð 2 dögum eftir aðgerð, en meðaltöl fyrir mELISA gildi voru hæst á degi 7. Magnbundinn munur var verulegur allan tilraunatímam og öll samanburðarsýni voru neikvæð, mynd 11. Munur mELISA gilda milli skammtahópa var mikill, eða 10-25 faldur. Staðalfrávik var hátt í flestum tilfellum. Aðhvarfslínur fyrir báða skammtahópa voru neikvæðar, sem merkir lækkun gilda með tíma. Gildið fyrir meiri skammtinn var -0.3035, sem er ekki marktækt í ANOVA greiningu, en fyrir lægri skammtinn var gildið -0.053, sem er marktækt í slíkri greiningu ( $p < 0.05$ ). Frekari skoðun á hópnum sem fékk lægri skammtinn, tafla 6, sýnir að bæði hlutfall jákvæðra í mELISA og meðaltal mælinga fer lækkandi með tímanum og að einungis 2 fiskar eru jákvæðir á 42. degi frá sprautun.



Mynd 10.

Súlur sýna meðaltal OD gilda í pELISA fyrir sýni úr fiski sem fékk 0,1 mg ECP (dökkar súlur) eða 1,0 mg (ljósar súlur). Regression línur eru sýndar, -0,031 fyrir minni skammtinn og 0,097 fyrir þann hærri.



Mynd 11.

Sútur sýna meðaltal OD gilda í mELISA fyrir sýni úr fiski sem fékk 0,1 mg ECP (dökkar sútur) eða 1,0 mg (ljóskar sútur). Regression línur eru sýndar, -0,053 fyrir minni skammtinn og -0,3035 fyrir þann hærri.

Tafla 6.

Fjöldi jákvæðra, meðaltöl og meðalfrávik fyrir OD gildi í pELISA og mELISA 2-42 dögum eftir að 0,1 mg ECP var sprautað í kviðarhol tilraunfiska.

0,1mg/fiskur	pELISA		mELISA	
Dagar frá sprautun	Jákv/fj. alls	meðaltal +/- SD	Jákv/fj. alls	meðaltal +/- SD
2 dfs	8/8	0,350 +/- 0,09	8/8	0,266 +/- 0,097
7 dfs	6/8	0,237 +/- 0,08	7/8	0,310 +/- 0,162
14 dfs	7/8	0,279 +/- 0,081	6/8	0,174 +/- 0,071
28 dfs	5/8	0,230 +/- 0,102	3/8	0,120 +/- 0,044
42 dfs	6/8	0,200 +/- 0,048	2/8	0,096 +/- 0,033

### Nýrnaveikifaraldur: úrvinnsla úr gögnum

Nýrnaveikibakterían greindist í fyrsta skipti á Íslandi árið 1968 í laxaseiðum í eldisstöð við Elliðaár og næsta tilfelli í annarri stöð árin 1977-78. Frá fyrstu greiningu bakteríunnar hér á landi, og þar til nú, má greina þrjú megin-skeið í sögu nýrnaveikinnar. Fyrsta tímabilið spannar árin 1985-1992, en þá varð nýrnaveiki verulegt vandamál í kjölfar mikillar aukningar á laxeldi. Næsta tímabil spannar árin 1992-2003, en þá hafði tekist að ná valdi á vandanum. Að lokum er svo tímabilið frá 2003 til 2007/2008 er nýrnaveiki greindist á ný í eldisstöð og síðan í allmörgum fleiri (fjöldi). Í viðauka er skýrsla sem send var sjóðnum með fyrstu framvinduskýrslu í febrúar 2008.

## Kynningar á niðurstöðum rannsóknarverkefnis

### *Skýrslur til AVS*

Sigríður Guðmundsdóttir, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason og Sunna Sigurðardóttir. 2008. Nýrnaveiki í laxfiskum: greining sýkingar og framvinda sjúkdóms. Skýrslur til AVS 01-02-08

Sigríður Guðmundsdóttir, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason og Sunna Sigurðardóttir. 2008. Nýrnaveiki í laxfiskum: greining sýkingar og framvinda sjúkdóms. Skýrslur til AVS 01-02-09

### *Fundir með fagaðilum*

Einstakar niðurstöður úr verkefninu hafa verið kynntar á fundum með fagaðilum á fundi fiskeldismanna á Húsavík vorið 2008 og hjá Fisksjúkdómanefnd. Lokaniðurstöður verða uppistaða í erindi SG á ráðstefnunni „Miðlun þekkingar til fiskeldismanna“ sem haldin verður á Hólum í Hjaltadal 13-14 október 2010.

Rannsóknirna hafa einnig verið kynntar víðar, m.a. á fundum rannsóknarnámsnema við Læknadeild (ÍOÁ) og við Alberta háskóla í Kanada og Westerns Fisheries Research Center, USGS, í Seattle (SG).

### *Ráðstefnur hérlendis og erlendis*

Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason and Sigríður Guðmundsdóttir (2008) Epidemiology of *Renibacterium salmoninarum* in farmed salmonids in Iceland. The 60<sup>th</sup> anniversary of The Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur. International Conference on Fish Diseases and Fish Immunology, 6-9 Sept 2008, Reykjavík, Iceland. Erindi.

Ívar Örn Árnason, Sunna Sigurðardóttir, Vilhjálmur Svansson, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason, Sigríður Guðmundsdóttir (2008) *Renibacterium salmoninarum*: a novel PCR and isolation of DNA from samples. The 60<sup>th</sup> anniversary of The Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Keldur. International Conference on Fish Diseases and Fish Immunology, 6-9 Sept 2008, Reykjavík, Iceland, p-35. Erindi.

Ívar Örn Árnason, Sunna Sigurðardóttir, Vilhjálmur Svansson, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason og Sigríður Guðmundsdóttir (2009). Einangrun DNA og greining nýrnaveiki-bakteríu í laxfiskum með sn-PCR. Fjórtaða ráðstefnan um rannsóknir í líf- og heilbrigðisvísindum í Háskóla Íslands, 5. og 6. janúar 2009. Ráðstefnurit: Læknablaðið, 95. árgangur, fylgirit 58, bls. 52. Erindi.

I. Arnason, S. Sigurðardóttir, V. Svansson, A. Kristmundsson, S. Helgason, H. Björnsdóttir and S. Gudmundsdóttir (2009) A new semi-nested PCR method to detect msa gene of *Renibacterium salmoninarum* and comparison to established methods. 14<sup>th</sup> International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Prague, 14 –19 September 2009. Conference handbook, p.155. Erindi.

Ívar Örn Árnason, Árni Kristmundsson, Sunna Sigurðardóttir, Sigurður Helgason, Harpa Lind Björnsdóttir, Vilhjálmur Svansson, Sigríður Guðmundsdóttir og Sunna Sigurðardóttir (2009) Nýrnaveiki í laxfiskum: samanburður aðferða sem greina mótefnavaka og kjarnsýrubúta nýrnaveikibakteríunnar. Líffræðirannsóknir á Íslandi, 6.-7. nóv. 2009, Reykjavík. Erindi.

Árni Kristmundsson, Þórólfur Antonsson, Friðþjófur Árnason og Sigríður Guðmundsdóttir (2010). Nýrnaveiki og PKD-sýki. - Ógn við villta laxfiskastofna á Íslandi ? Erindi haldið á Ársfundi Veiðimálastofnunar sem haldinn var á Hótel Loftleiðum þann 15. Apríl, 2010. Erindi.

Sigríður Guðmundsdóttir, Ívar Örn Árnason, Árni Kristmundsson og Diane Elliott (2010) Nýrnaveikibakterían í villtum urriða: greining í mismunandi vefjasýnum. Vísindadagur á Keldum 2010. Bls 9. Erindi.

Ívar Örn Árnason, Sunna Sigurðardóttir, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason, Vilhjálmur Svansson og Sigríður Guðmundsdóttir (2010) Nýrnaveikibakterían í sýktum eldisklaxi: samanburður greiningaraðferða. Vísindadagur á Keldum 2010. Bls 10. Erindi.

#### *Greinar í vísindatímaritum*

Ivar Orn Arnason, Sunna Sigurdardottir, Arni Kristmundsson, Vilhjalmur Svansson, Sigurdur Helgason and Sigríður Guðmundsdóttir. *Renibacterium salmoninarum*: A semi-nested PCR and isolation of DNA from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using FTA minicard. Submitted 2010. Sjóðurinn verður upplýstur um framhaldið.

#### *Meistaraprófsritgerð*

Ívar Örn Árnason. Detecting *Renibacterium salmoninarum* in cultured and wild salmonids. Ritgerð til meistaragraðu í Líf- og læknávisindum. Læknadeild. Heilbrigðisvísindasvið Háskóla Íslands. Júní 2010. Ritgerðin er á ensku.

## 4. Umræða og ályktanir

Tímaáætlun og fjárhagsáætlun stóðust að mestu hugmyndir sem settar voru fram í upphaflegri umsókn, en tilraunavinna tók nokkrum breytingum eins og fram er komið og sjóðsstjórn var upplýst um í bréfi á rannsóknatímanum.

### 4.1. Kjarnsýruhreinsun, vísar og þreifingar

#### DNA einangrun

Helstu nýmæli við einangrun DNA voru af tvennum toga. Notkun FTA pappírs til einangrunar gDNA gaf marktækt betri árangur, en fæst með hefðbundnu DNA-hreinsunarkitti. Framleiðendur segja að hægt sé að varðveita sýni á FTA pappír við stofuhita árum saman án þess að hafa áhrif á gæði gDNA. Þetta er til mikillar hagræðingar og var sannreynt á Keldum fyrir sýni sem höfðu verið þrjú ár í geymslu. Öll sýni, sem sett voru á FTA pappír í verkefninu, eru varðveitt svo hægt er að endur taka mælingar og prófa fleiri sýni til staðfestingar ef þurfa þykir.

Í hefðbundnum DNA-hreinsunarkittum er próteinasi-K notaður í sýnameðhöndlun fyrir PCR. Í rannsókninni var staðfest að ensímið achromopeptidasi var öflugra en próteinasi-K við rof á *R. salmoninarum*. Þetta átti við um allar gerðir sýna, þ.e. úr hreinræktaðri bakteríu, nýrnasýnum eða hrognavökva.

Í samræmi við aðferðalýsingu frá Danmörku var einnig prófað að einangra kjarnsýru úr sýnum sem búið var að meðhöndla fyrir ELISA próf. Þau reyndust illa fallin til kjarnsýru-einangrunar, en það má hugsanlega grípa til þessarar aðferðar þegar önnur sýni eru ekki tiltæk. Í slíkum tilfellum væru jákvæð svör styðjandi við greiningu með pELISA en neikvæð svör ekki afgerandi.

#### Hönnun vísa fyrir semi-nested PCR

Í snPCR, jafnt sem nPCR, eru 2 bútar magnaðir upp, en úr mismunandi stöðum á msa geni bakteríunnar. Í báðum tilfellum er annar búturinn stærri (ytri) og síðan er minni bútur innan sama svæðis. Þetta gerir það að verkum, að líkur á ósértækri uppmögnun (falskt jákvætt svar) eru hverfandi og miklu minni en gerist í einföldu PCR. Kosturinn við snPCR umfram nPCR, er að tvö hvörf verða í einu glasi, með 3 vísam (primers), svo ekki er þörf á að flytja búta sem búið er að magna milli glasa með tilheyrandi mengunarhættu. Binding vísanna við DNA bútin gerist við mismunandi hitastig og því fer bindisæknin eftir hitastigi hvarfsins á hverjum tímamarki. Í nPCR eru 4 vísar sem samsvara röðum í msa geninu, sem mynda tvö vísapör, en þau eru notuð í aðskildum PCR hvörfum. Fyrri vísaparið er keyrt í PCR mögnunarferli og lausnin síðan flutt í nýtt glas með seinna vísaparinu. Niðurstöður snPCR og nPCR sjást með því að rafdraga afurð hvarfanna í geli. Gelið inniheldur ethídíum brómið sem bindst DNA og ljómar undir flúrljósi. Hafri mögnun orðið, sjást bönd í gelinu og til viðmiðunar er stærðarstaðall til að meta stærð þeirra. Mynd er tekin af gelinu til varðveislu niðurstaðna. Þessi vinna er all tímafrelk og ethídíum brómið er skilgreindur krabbameinsvaldur. Hvoru teggja er mínus fyrir þessar aðferðir í samanburði við qPCR.

## RNA einangrun

*R. salmoninarum*, er afar þolin gagnvart hefðbundnum aðferðum við bakteríurof. Eldri verklýsingar fyrir einangrun RNA úr *R. salmoninarum* byggja á mikilli notkun eitrefna s.s. phenols (stundum tvítekið) og sodium dodecyl sulfats (SDS). Stefnt var að því að reyna að finna sem einfaldasta einangrunaraðferð, þar sem nokkun eitrefna væri jafnframt í lágmarki. Þetta er mikilvægt atriði þegar um er að ræða aðferðir sem á að beita á mikinn fjölda sýna. Prófaður var fjöldi aðferða og sú sem að lokum kom best út er Trizol-aðferð að viðbætti meðhöndlun með achromopeptidasa. Reyndist þessi verkþáttur afar tímafrekur. Sýna þarf mikla gát við einangrun RNA, bæði vegna hreinsiefna og sérstaklega þarf að gæta þess að sýni mengist ekki af RNAsa, sem er alls staðar í umhverfinu, og brýtur niður RNA í sýninu.

## Hönnun RT-qPCR aðferða

Hugtakanotkun varðandi PCR getur verið með ýmsu móti og hefur það skapað nokkurn vanda. Við kusum að nota RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction) yfir þá PCR aðferð þar sem RNA er einangrað og umritað yfir í cDNA með ensíminu reverse transcriptase. cDNA er svo sett í rauntíma eða „quantitative“ PCR, þ.e. mögnunin er metin út frá því hversu mikið cDNA er til staðar, sem aftur endurspeglar magn RNA sem einangraðist upphaflega úr sýninu. Vísar og þreifarar (probes) voru hannaðir fyrir RT-qPCR prófin. Þeir greina annars vegar svæði innan 16S rRNA gens bakteríunnar og hins vegar innan msa gens nýrnaveikibakteríunnar. Þar sem msa vísar og þreifari reyndust síðri til greininga en áður birt aðferð (Chase et al., 2006), var þeim ekki beitt frekar. Genið fyrir msa er einstakt fyrir nýrnaveikibakteríuna og á sér ekki samsvörun í öðrum raðgreindum bakteríutegundum (Wiens et al., 2008. Í tilviki 16S rRNA gensins er erfiðara að finna öruggt svæði, vegna mikillar samsvörunar gensins við gen annarra bakteríutegunda. Þær bakteríur sem eru skyldastar *Renibacterium salmoninarum* eru bakteríur úr *Arthrobacter* ættkvíslinni. Forritið “BioEdit sequence alignment editor” var notað til að finna vænlegt svæði á geninu. Genaraðir úr nokkrum skyldustu *Arthrobacter* tegundunum (skv. BLAST á heilum ofangreindum genaröðum) voru hafðar til samanburðar við genaraðir nýrnaveikibakteríunnar. Samanburður var gerður á raðgreiningunum og skimað eftir hentugum svæðum fyrir hönnun vísa. Það svæði á geninum sem hafði minnstu samsvörun á milli raðgreininga *R. salmoninarum* og *Arthrobacter* tegunda var lokum valið, svæði sem er einstakt fyrir nýrnaveikibakteríu og hentar því til hönnunar vísa og þreifara.

Almennt er reiknað með að RT-qPCR próf séu næmari en önnur PCR próf gagnvart bakteríum, en það reyndist ekki vera svo í þessari rannsókn. Hér þarf að hafa í huga að *R. salmoninarum* er hægvoxta innanfrumusýkill og fyrir þær sakir mjög erfið viðfangs á allan hátt, líka í greingarprófum. Gagnvart bakteríum með líffræði *R. salmoninarum* getur verið mikilvægt að hafa próf sem byggir á einangrun RNA, því tilvist þess er órækt merki um að virk bakteríusýking sé til staðar. Hins vegar eru slík próf mun vandmeðfarnari og miklu dýrari en þau próf sem greina DNA og á það við um öll stig framkvæmdar, sýnatöku, geymslu, meðhöndlun sýna og sjálfa PCR greininguna. Eins og áður sagði var næmi þeirra minna en snPCR og nPCR, sem kom nokkuð á óvart, en sýnir að ekki er hægt að ganga að nokkru sem gefnu þegar *R. salmoninarum* er annars vegar.

## 4.2 Hópar fiska sem prófaðir voru

### Hópur 1. Eldisfiskur

#### a) klaklax

Þessi hópur var sérstaklega mikilvægt rannsóknarefni, þar sem virk sýking var í hópnum og eðlilegt að reikna með að hún væri á misjöfnu stigi í einstaklingunum, sem líka koma á daginn. Þegar sýnin voru tekin, voru stórsæjar sjúkdómsbreytingar þó einungis komnar fram í fáum einstaklingum en einungis einn þeirra var í úrtaki fyrir verkefnið. Alls voru 65% sýnanna jákvæð í pELISA sem greinir mótefnavaka með fjölstofna mótefnum, en einungis 17,5% voru jákvæð þegar notað var mELISA kitt frá GrupoBios í Chile þar sem einstofna mótefni eru notuð til greiningar. Athyglisvert er, að einungis einn hrognavökvi var jákvæður í pELISA og viðkomandi hrygna var greinilega með sýkingu á háu stigi, þar sem allar aðferðir, í öllum líffærum gáfu jákvæða niðurstöðu. pELISA á hrognavökva er talsvert notuð í N-Ameríku til greiningar á *R. salmoninarum* sýkingu (Elliott et al., 1995), en samkvæmt framangreindu væri slík nálgun gagnslítill við íslenskar aðstæður. Þetta bendir annað hvort til þess að bakterían, eða mótefnavakar hennar, berist fremur í hrognavökva Kyrrahafslaxa en Atlantshafslax eða hugsanlega þess að þar sé verið að mæla sýkingu á enn hærra stigi.

Semi-nested og nested PCR greindu nokkru færri sýni en pELISA, en munurinn var ekki marktækur í kjíkvæðrat prófi. snPCR og nPCR aðferðunum bar mjög vel saman, þ.e. það voru sömu sýnin sem gáfu jákvæð svör, nema hvað eitt sýni, sem var jákvætt í n-PCR, var neikvætt í sn-PCR. Hrognavökvasýni voru prófuð með þessum PCR aðferðum, með það í huga að hugsanlega mætti nota hann til sýnatöku í stað nýrnasýna. Þar sem jákvæð sýni voru marktækt færri en jákvæð nýrnasýni, er ekki hægt að mæla með að svo verði gert. Til þess þyrfti að gera umfangsmiklar samanburðartilraunir á afkomendum klakfiska með mismunandi útkomur í slíkum prófum.

#### b) bleikja í eldi

Sýni voru tekin úr bleikju sem geymd var í sömu eldisstöð og klaklaxinn. Grunur lék á að smit væri að finna í þessum hópi. Eitt nýrnasýni af 30 reyndist örlítið hækkað í pELISA. Ekkert þessara sýna var jákvætt í PCR, hvorki nested né semi-nested. Hrognavökvasýni úr 30 bleikjum voru neikvæð í ELISA, sn-PCR og n-PCR. Því er ljóst, að hafi smit verið til staðar í bleikjuhópnum, kom það ekki fram í þessu úrtaki með framangreindum aðferðum.

### Hópur 2. Villtur fiskur

Eins og gerð var grein fyrir í skýrslu til sjóðsins 2008, var gripið til tvenns konar aðgerða þegar ljóst var orðið að ekki yrði unnt að gera sýkingartilraun á verkefnistímanum eins og til var stofnað. Önnur ráðstöfunin var að afla sýna úr vatnakerfi þar sem vitað var að bakterían var til staðar. Í ljós komu ýmis áhugaverð atriði og jafnframt skýrar ábendingar um að þessi efniviður væri mjög ólíkur eldishópnum. Þannig var munur á hlutfall jákvæðra í pELISA og PCR mun meiri en í eldisklakfiskinum. Enn fremur voru fá sýni með há gleypnigildi í pELISA og meðaltalsgleypnigildið í sýnahópnum var lægra en í eldishópnum. Engin sjúkdómseinkenni fundust í fiskunum og raunar greinast stórsæ sjúkdómseinkenni sjaldan í villtum fiski (Jónsdóttir et al., 1998; Meyers et al., 1999).

#### a) gönguseiði og klaklax úr Elliðaám

Í sýnum sem tekin voru úr fiski í Elliðaám sýndu pELISA mælingar að sjógönguseiði fara smituð úr ánni, en mæligildin voru mjög lág í öllum sýnum nema tveimur. Þegar laxaseiði fara í sjógöngubúning eða “smolta”, þá er mikill álgastími í lífsferli þeirra, sem minnkar mótstöðuafli gegn sýkingum og *R. salmoninarum* smitmögnun getur aukist (Mesa et al., 1999).

Í sjónum nær fiskurinn að margfalda þyngd sína og eftir ársdvöl í sjó, greinast flestir göngulaxarnir neikvæðir í pELISA. Annað hvort hefur fiskinum því tekist að útrýma bakteríunni úr líkama sínum eða að bakterían hafi farið í dvala í fiskunum eins og þekkt er í lífsferli skyldra baktería s.s. *Mycobacterium tuberculosis* (Nuermberger et al 2004) og *Mycobacterium marinum* (Stamm et Brown., 2004). Eftir því sem dvöl göngulaxanna í ánni lengdist, því fleiri greindust jákvæðir í pELISA auk þess sem gleypnigildin í prófinu hækkuðu. Annað hvort var fiskurinn því að endursmitast með lárétu smiti í árvatninu og/eða að baktería í dvala náði sér á strik vegna aukins álags í umhverfinu og ónæmisbælingar sem fylgir kynþroskanum. Krónísk sýking sem veldur ekki dauða, eykur líkur á smiti milli kynslóða með hrognum, en sú leið er mikilvæg í lífsferli *R. salmoninarum* (Dale, 1994). Önnur líkleg skýring á vaxandi hlutfalli jákvæðra fiska í ánni, þegar sem líður á sumarið, kann að vera afleiðing af vaxandi þéttni bakteríunnar í árvatninu. Í eldri rannsókn voru laxar, upprunnir úr Elliðaám, neikvæðir fyrir mótefnavökum *R. salmoninarum*, geymdir í sleppitjörn, með árvatni. Eftir mánaðardvöl í sleppitjörninni voru 76% fiskanna orðnir jákvæðir í pELISA (Kristmundsson, personal communication). Að lokum má benda á að smitmagn skv. pELISA í desember hópnum, var miklu lægra en í sýnunum úr eldislaxinum í hópi 1a, og ekkert þessara sýni var jákvætt í snPCR eða nPCR.

#### b) bleikja og urriði úr Elliðavatni 2008

Bleikja og urriði, sem veidd voru í Elliðavatni síðsumars 2008, voru með 89% og 98% hlutfall jákvæðra í pELISA. Þessar tölur eru mun hærri en fram komu í rannsókn 1993 þegar smittíðnin í bleikju var 16% og urriða 27% (Jónsdóttir et al., 1998). Magn mótefnavaka bakteríunnar mælt með pELISA var líka herra en 1993. Breyting af þessu tagi er ekki bundin við Elliðavatn og tengdar ár, heldur er svipaða sögu að segja víðsvegar um landið sjá viðauka og Kristmundsson et al., (2009). Á árunum 1988 til 2006 voru gerðar langtíma rannsóknir á umhverfispáttum í Elliðavatni. Í ljós kom m.a., að á þessum 18 árum hækkaði meðalhitastigið í ánni marktækt (Malmquist et al., 2009). Hitastigsbreyting gæti á þátt í aukinni smittíðni *R. salmoninarum* í fiskastofnum í ám og vötnum landsins síðustu ár. Hitabreytingin er að auki talin orsakavaldur PKD sýkingar sem fannst í fyrsta sinn hérlendis í Elliðavatni haustið 2008 (Kristmundsson et al., 2010).

Munurinn á smittíðninni milli bleikjunnar og urriðans var ekki marktækur. Erfitt er að bera smittíðni þessara tegunda í Elliðavatni við smittíðni laxsins í Elliðaánum, vegna ólíkra umhverfisaðstæðna og lífsferils. Bleikjan og urriðinn í Elliðavatni fara aldrei í sjógöngubúning og eru í ferskvatni allan lífsferilinn.

Í ljósi þess hve hlutfall jákvæðra sýna í pELISA prófi var hátt í sýnahópnum, er athyglisvert hversu fá sýni voru jákvæð í PCR og þá einvörðungu í nPCR, sjá mynd 7. Þetta er gjörólíkt því sem fannst í eldisklaklaxinum. Mikilvægt er að átta sig á því í hverju munurinn liggur, en til þess þarf áframhaldandi rannsóknir.

#### c) Bleikja og urriði úr Elliðavatni 2009

Sýni út þessum hópi voru prófuð í qPCR prófi, auk þeirra prófa sem notuð voru árið áður. Eins og þá, greindi pELISA marktækt flest jákvæð sýni, síðan kom qPCR og loks nPCR. Samanburður gleypnigilda í pELISA prófinu og Ct gilda í qPCR prófinu, sem magnar upp msa genið, sýndi ekkert samræmi. Sú staðreynd, að pELISA aðferðin greinir fleiri mótefnavaka *R. salmoninarum* en MSA, getur valdið þessu ósamræmi. Samræmi milli gleypnigildis mELISA og pELISA og Ct gildis qPCR prófs hefur komið fram í sýkingartilraun (Jansson et al., 2008). Gerð var tilraun til ræktunar á SKDM agar, en bakterían ræktaðist ekki, svo eðlilegt er að velta því fyrir sér hvort ræktanlega bakteríur hafi verið í nýrnasýnunum. Einnig er hugsanlegt að fjöldi baktería hafi verið fyrir neðan greiningarmörk ræktunaraðferðarinnar eða þá að bakterían fjölgi sér í einkum í einhverju öðru líffæri. Niðurstöður pELISA og ræktunar hafa marg oft verið bornar saman og pELISA hefur oftast reynst næmari (Pascho et al., 1987; Gudmundsdóttir et al., 1993; Olea et al., 1993). Ræktun var næmari í einni rannsókn, en þar var notuð mELISA til samanburðar (Griffiths et al., 1996). Marktækur munur var á fjölda jákvæðra einstaklinga skv. pELISA niðurstöðum í urriðaðanum í Elliðavatni 2008 (98%) og 2009 (74%), en ekki er hægt að fullyrða að hóparnir hafi verið sambærilegir að öllu leiti.

#### d) sýni úr Vatnaverkefni

Sýni tekin vegna „Vatnaverkefnisins“ (Jónsdóttir et al., 1998) voru varðveitt í frystigeymslu fisksjúkdómadeildar. Þar sem þau sýni voru einvörðungu prófuð með pELISA á sínum tíma, var bæði áhugavert að athuga hvort sýnin væru nothæf í PCR próf og fá niðurstöður úr slíku prófi. Notuð voru sýni úr nýrnabítum úr urriða, sem veiddur var í Mývatni og Lagarfljóti í Vatnaverkefninu. Í ljós kom, að unnt er að magna gDNA bakteríunnar úr nýrnabítum sem hafa verið allt að 15 árum við -20°C.

### 4.3 Utanfrumuafurðir *R. salmoninarum* og afdrif þeirra í laxaseiðum

Sterkustu böndin í silfurlitun og mótefnalitun voru 59 kDa og 58 kDa. Mótefnið sem notuð voru eru einstofna mótefni gegn MSA, svo böndin sýna án efa rétta próteinið. Mótefnið greindi einnig 50 kDa band sem er væntanlega MSA sem hefur brotnað niður. Þar sem engin smærri bönd lituðust, er greinilegt að próteinið var að mestu í heilu lagi og vatnsrof á því á lágu stigi (Wiens & Kaattari, 1991).

Fiskur sem fékk utanfrumuafurðir í kviðarhol svaraði jákvætt bæði í pELISA og mELISA. Sýni voru prófuð óþynnt í mELISA, en þynnt 33 sinnum fyrir pELISA, til að fá OD gildi á svipuðum skala. Skýringin á þessu er væntanlega sú að pELISA greinir fjölda sameinda auk MSA og enn fremur marga ónæmisvaka á hverri stórsameind.

pELISA meðaltalsgildin breyttust lítið á þeim 6 vikum sem tilraunin stóð. Þó voru 2-3 fiskar af átta neikvæðir við hverja sýnatöku fyrir fiskinn sem fékk 0,1 mg ECP. mELISA gildi í þessum fiski mældu mesta breytingu. OD-meðaltölin lækkuðu og hlutfall neikvæðra sýna jókst við hverja sýnatöku. Í lokin voru einungis 2 af 8 fiskum jákvæðir. Framangreindar niðurstöður sýna að utanfrumuafurðir geta greinst í nýra í talsvert langan tíma eftir að þær byrja að safnast þar upp. Skammtastærðir í þessari tilraun voru langt yfir þeim mörkum sem búast má við í náttúrulegri sýkingu, enda var þessi tilraun hugsuð sem fyrsta skref, ætlað til að fá ábendingar um uppsetningu ítarlegri tilrauna.

Í tilraun til böðunar í utanfrumuafurðum greindust engin jákvæð sýni með ELISA. Það svarar ekki spurningunni um það hvort fiskurinn geti tekið upp utanfrumuafurðir eða einstakar sameindir þeirra úr umhverfinu, heldur sýnir bara að böðun í tvær og hálf klst. dugar ekki til þess. Hins vegar má benda á, að ómeðhöndlaðir samanburðarfiskar, sem voru í kerri með sprautaða fisknum allan tilraunatímann, voru allir með neikvæðar mælingar í báðum ELISA prófunum í lok tilraunar, sem sýnir að fiskurinn tók ekki upp mótefnavaka úr umhverfinu, a.m.k. ekki í mælanlegu magni.

Í ljósi ofanskráðra atriða er einsýnt að pELISA verður áfram aðal skimunarprófið í þjónusturannsóknum, en nested- og semi-nested PCR prófin eru nú tiltæk sem mikilvæg staðfestingarpróf og rannsóknatæki. Að auki eru qPCR og RT-qPCR prófin sem koma að notum við sérstakar aðstæður og rannsóknir á eðli sýkingarinnar. Þá er komið í ljós að hvorki hrognavökvi né tálknasýni geta komið í stað nýrnasýna við skimun og greiningar. Mikið hagræði er að notkun FTA pappírs til varðveislu sýna fyrir bæði PCR prófin. Unnt að setja sýni á pappír um leið og sýni er undiðbúið fyrir ELISA próf og grípa til þess ef þörf krefur, t.d. staðfesting á nýsmíti í eldisstöð.

### **Mikilvægar niðurstöður**

PCR próf sem þróað var í verkefninu, snPCR, var sambærilegt að næmi, en öruggara og ódýrara en nPCR próf sem OIE mælir með.

- Notkun FTA pappírs við einangrun kjarnsýra er einfaldari og ódýrari leið en hreinsun með DNA-kitti. Þá er langtíma geymsla slíkra sýna auðveld.
- Meðhöndlun sýna með achromopeptidasa bætir árangur þegar DNA-kitt er notað til að einangra DNA (gerðum í raun engan samanburð).
- Niðurstöður snPCR og nPCR greininga á nýrnasýnum úr mikið sýktum laxahópi gáfu svo til sama næmi og 94,4% samsvörun. Þau greindu færri, en ekki marktækt færri jákvæð sýni í hópi með virka sýkingu, en pELISA.
- qPCR og RT-qPCR voru síðri greiningartæki og gáfu ekki jákvæðar niðurstöður í hópi með virka sýkingu fyrr en pELISA gildi var orðið hátt ( $OD_{492} \geq 0.750$ ).
- pELISA greindi flest jákvæð sýni í öllum hópum.
- mELISA er ónothæf við íslenskar aðstæður.
- Hrognavökvi og tálknasýni eru ekki heppileg sýni, hvorki fyrir sjúkdómsgreiningu né skimun.
- Niðurstöður úr villtum fiski sýna að birtingarmynd smitsins er mjög ólík því sem gerist í eldishópi með virka sýkingu.

Smit í urriða og bleikju, sem ekki ganga til sjávar, gæti verið mikilvæg uppspretta smits í sjógönguseiðum laxins.

### **Næmi eða þol?**

Notkun orðanna næmi (susceptibility) eða þols (resistance) vekja ýmsar spurningar þegar sýkill eins og *R. salmoninarum* á í hlut. Hugsanlegt er að þol tiltekinnar tegundar byggji á öflugum ónæmissvari sem haldi sýkingunni í skefjum (Dale, 1994). Einnig getur verið um að ræða aðlögun að sýklinum sem byggist aftur á lítilli ónæmissvörun. Þolni gagnvart *R.*

*salmoninarum* gæti hafa þróast í ferskvatnsfiski, þar sem nábyli við sýktan fisk er stöðugt og líkur á smiti umtalsverðar (Meyers et al., 1999). Niðurstöður víðtækrar rannsóknar á vatnafiski benda til þess að bakterían valdi oftast en ekki vægu smiti í villtri bleikju og urriða (Jónsdóttir et al., 1998). Líklegt er, að sjúkdómseinkennum sem einkenna svæsnar sýkingar, endurspegli einkum viðbrögð ónæmiskerfisins við sýkingunni (Young & Chapman, 1978). Því er mögulegt að ónæmiskerfi ónæmari fisktegunda sýni litla ónæmissvörun, bakterían haldist við í hýslinum og fjölgi sér hægt. Ef þetta er rétt tilgáta, er hugtakið næmur ekki heppilegt við þessar aðstæður.

### **Nokkur orð um faraldsfræði**

Þekking á faraldsfræði *R. salmoninarum* á Íslandi hefur aukist talsvert undanfarin ár. Það hefur ítrekað sýnt sig, að það er nauðsynlegt að fylgjast vel með, vanda skráningu, og framkvæmd, jafnt sjúkdómsgreininga sem eftirlits- og rannsóknaverkefna. Síðasti faraldur í eldisfiski reyndist atvinnugreininni afar dýr og skerpti á nauðsyn öruggra sóttvarna og þekkingar á mismunandi eðli sjúkdómsvalda í eldi laxfiska. Hvað varðar fiskirækt, þá virðist reynsla undanfarinna ára benda til þess að yfir standi breytingar í vistkerfi vatna og áa, sem undirstrikar enn frekar nauðsyn eftirlits. Mikilvægi þess að aðskilja fisk í eldi og fisk sem geymdur er til ræktunar var einnig rækilega undirstrikað, því líklegt er að uppruni faraldursins er hófst 2003 hafi einmitt verið í smiti sem barst úr villtum klakfiski, í eldisseiði. Einnig hefur komið í ljós að við geymslu á villtum klakfiski verður oft mikil smitmögnun, en unnt er að draga úr henni í mörgum tilfellum eins og þegar hefur verið sýnt fram á (Kristmundsson et al., 2009).

**Þakkarorð:** Dr. Sunnu Sigurðardóttur, sérfræðingi á Lífeinda- og sameindalíffræðistofu HÍ, er þökkuð mikilvæg samvinna og frábær ráðgjöf við þróun aðferða. Starfsmönnum í Kirkjuvogi og á Veiðimálastofnun, auk Gísla Jónssonar dýralækni fisksjúkdóma, er þökkuð mikilsverð aðstoð við sýnatöku, starfsmönnum á Keldum er þökkuð tæknileg aðstoð og gagnlegar umræður og forsvarsmenn á Keldum fá þökk fyrir aðstöðuna.

## Heimildir

Benediktsdottir, E., S. Helgason, et al. (1991). "Incubation time for the cultivation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish." *Journal of Fish Diseases* 14(1): 97-102.

Chase, D. M. and R. J. Pascho (1998). "Development of a nested polymerase chain reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of *Renibacterium salmoninarum* that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in salmonid kidney." *Diseases of Aquatic Organisms* 34(3): 223-9.

Chase, D. M., D. G. Elliott, et al. (2006). "Detection and quantification of *Renibacterium salmoninarum* DNA in salmonid tissues by real-time quantitative polymerase chain reaction analysis." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18: 375-380.

Cvitanich, J. D. (1994). "Improvements in the direct fluorescent antibody technique for the detection, identification, and quantification of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney smears." *Journal of Aquatic Animal Health* 6(1): 1-12.

Dale, O.B. (1994) *Bacterial Kidney Disease in Salmonid Fish. A study on Virulence and Diagnostic Techniques.* (Doctor Scientarum). Oslo: Norwegian College of Veterinary Medicine.

Elliott, D. G., Pascho, R. J., Palmisano, A. N. (1995). Brood stock segregation for the control of bacterial kidney disease can affect mortality of progeny chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater. *Aquaculture*; 132(1-2): 133-44.

Griffiths, S. G., Liska, K., Lynch, W. H. (1996). Comparison of kidney tissue and ovarian fluid from broodstock Atlantic salmon for detection of *Renibacterium salmoninarum*, and use of SKDM broth culture with western blotting to increase detection in ovarian fluid. *Diseases of Aquatic Organisms*; 24(1): 3-9

Gudmundsdottir, S., S. Helgason, et al. (1991). "Comparison of the effectiveness of three different growth media for primary isolation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish." *Journal of Fish Diseases* 14(1): 89-96.

Gudmundsdottir, S., E. Benediktsdottir, et al. (1993). "Detection of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney samples: A comparison of results using double-sandwich ELISA and isolation on selective medium." *Journal of Fish Diseases* 16(3): 185-195.

Gudmundsdottir, S., S. Helgason, et al. (2000). "Measures applied to control *Renibacterium salmoninarum* infection in Atlantic salmon: a retrospective study of two sea ranches in Iceland." *Aquaculture* 186(3-4): 193-203.

Sigríður Guðmundsdóttir, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason og Sunna Sigurðardóttir. 2008. Nýrnaveiki í laxfiskum: greining sýkingar og framvinda sjúkdóms. Skýrslur til AVS 01-02-08

Sigríður Guðmundsdóttir, Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason og Sunna Sigurðardóttir. 2008. Nýrnaveiki í laxfiskum: greining sýkingar og framvinda sjúkdóms. Skýrslur til AVS 01-02-09

Helgason, S. (1985). Diseases of salmonids on fish farms in Iceland. Aquaculture - miljøproblem, Bergen, Norway, NORDFORSK Miljøvårdsserien. fishes." Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 92: 85-88.

Jansson, E., Lindberg, L., Saker, E., Aspan, A. (2008). Diagnosis of bacterial kidney disease by detection of *Renibacterium salmoninarum* by real-time PCR. J Fish Dis; 31(10): 755-63.

Jónsdóttir, H., Malmquist H.J., Snorrason, S.S., Guðbergsson, G. and Guðmundsdóttir, S. (1998) Epidemiology of *Renibacterium salmoninarum* in wild Arctic char and brown trout in Iceland. Journal of Fish Biology, 53, 322-339

Árni Kristmundsson, Sigurður Helgason og Sigríður Guðmundsdóttir (2009) Nýrnaveiki í laxfiskum á Íslandi. Veiðimaðurinn, nr. 188, bls 64-66

Kristmundsson A., Antonsson, Th. And Árnason F. (2010) First report og Prolifarative Kidney Disease in Iceland. Bull Eur Ass Fish Pathol; 30: 35-40

Malmquist, H., Antonsson, T., Ingvarsson, H. R., Ingimarsson, F., Arnason, F. (2009). Salmonid fish and warming of shallow Lake Ellidavatn in Southwest of Iceland. Verh Internat Verein Limnol; 30: 1127-32.

Mesa, M. G., Maule, A. G., Poe, T. P., Schreck, C. B. (1999). Influence of bacterial kidney disease on smoltification in salmonids: is it a case of double jeopardy? Aquaculture; 174(1-2): 25-41.

Meyers, T. R., Thrower, F., Short, S., Lipson, K., Joyce, J., Farrington, C., et al. . (1999). Different prevalences of *Renibacterium salmoninarum* detected by ELISA in Alaskan chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* spawned from freshwater and seawater. Dis Aquat Organ; 35(2): 101-5.

Nuermberger, E., Bishai, W. R., Grosset, J. H. (2004). Latent tuberculosis infection. Semin Respir Crit Care Med; 25(3): 317-36.

Olea, I., Bruno, D. W., Hastings, T. S. (1993). Detection of *Renibacterium salmoninarum* in naturally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using an enzyme-linked immunosorbent assay. Aquaculture; 116(2-3): 99-110.

Pascho, R. J., Elliott, D. G., Mallett, R. W., Mulcahy, D. (1987). Comparison of five techniques for the detection of *Renibacterium salmoninarum* in adult coho salmon. Transactions of the American Fisheries Society; 116: 882-90.

Stamm L.M. and Brown E.J. (2004) *Mycobacterium marinum*: The generalization and specialization of a pathogenic bacterium. Microbes and Infection, 6, 1418-1428

Wiens, G. D., Kaattari, S. L. (1991). Monoclonal antibody characterization of a leukoagglutinin produced by *Renibacterium salmoninarum*. Infect Immun; 59(2): 631-7.

Wiens. G.W. et al (2008) Genome sequence of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum* suggests reductive evolution away from an environmental *Arthrobacter* ancestor. Journal of Bacteriology, 10, 6970-6982

Young, C. L., Chapman, G. B. (1978). Ultrastructural Aspects of Causative Agent and Renal Histopathology of Bacterial Kidney-Disease in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada; 35(9): 1234-48.

## Faraldsfræði nýrnaveiki á Íslandi

Viðauki með tilraunaskýrslu 1, 1. feb, 2008

Nýrnaveiki í laxfiskum: greining sýkingar og framvinda sjúkdóms

Verknúmer: AVS R076-07

Styrktaraðili auk AVS: Tilraunastöð Háskóla Íslands í meinafræði, Keldum við Vesturlandsveg, 112-Reykjavík.

### Eldisfiskur

#### *Almennt*

Nýrnaveiki af völdum bakteríunnar *Renibacterium salmoninarum* greinist í laxfiskum víða um heim. Bakterían hefur nokkra sérstöðu meðal sýkla er sýkja laxfiska því hún getur borist inni í hrognum frá sýktri hrygnu til afkvæmis. Smittíðni í villifiskum er jafnan lág og eru faraldrar af völdum bakteríunnar sjaldgæfir í náttúrunni. Ekki er vitað um nýrnaveikifaraldrar í villifiskum hér á landi. Berist bakterían hins vegar í fiskeldisstöð sýnir reynslan að sýkin magnast þar og verður þá tíðum lítt viðráðanleg.

Bakterían greindist í fyrsta skipti á Íslandi árið 1968 í laxaseiðum í eldisstöð við Elliðaár. Næsta tilfelli varð svo í annarri stöð árin 1977-78. Frá fyrstu greiningu bakteríunnar hér á landi, og þar til nú, má greina þrjú megin-skeið í sögu nýrnaveikinnar. Fyrsta tímabilið spannar árin 1985-1992, en þá varð nýrnaveiki verulegt vandamál í kjölfar mikillar aukningar á laxeldi. Næsta tímabil spannar árin 1992-2003, en þá hafði tekist að ná valdi á vandanum. Að lokum er svo tímabilið frá 2003 er nýrnaveiki greindist á ný í eldisstöð og síðan í allmörgum fleiri.

Strax haustið 1985, í kjölfar 1985-hrinunnar, hóf Rannsóknadeild físksjúkdóma á Keldum kerfisbundna skimun fyrir nýrnaveikibakteríunni í klakfiskum til þess að hindra smitdreifingu með hrognum frá sýktu foreldri og hefur skimunin staðið óslitin síðan. Allar hrygnur til undaneldis úr hafbeitarstöðvum eru skimaðar svo og úrtak klakfiska af eldisuppruna. Á tímabilinu hafa vissar breytingar orðið á greiningaraðferðum. Í fyrstu var bakterían einangruð úr vefjum fiska á valæti, en frá 1991 hefur mótefna- (ELISA-) prófi verið beitt.

#### **1985-1992**

Fjórar eldisstöðvar tengdust 1985-faraldrinum, þar af voru tvær svokallaðar hafbeitarstöðvar. Í hafbeitarstöðvunum varð nýrnaveiki-faraldrurinn sérstakur fyrir þá sök að

klakfiskar voru valdir úr hópi fiska sem komu af hafi hvert sumar. Við geymslu þeirra frá sumri til hrognatöku að hausti magnaðist nýrnaveikismit verulega og náði smittíðni allt að 40% í stöku fiskahópum. Nýrnaveikin varð þar verulegt vandamál. Kerfisbundin skimun klakfiska og förgun hroгна undan sýktum fiskum skilaði hins vegar góðum árangri, því smittíðni sem í sumum klakfiskahópunum varð allt að 40% árið 1986 náðist niður í 0% árið 1992.

### 1992-2003

Vegna markvissrar skimunar klakfiska og annarra hefðbundinna smitvarnaraðgerða tókst árið 1992 að ná tökum á nýrnaveiki í íslensku laxfiskaeldi og var tíðindalítið á þeim vígstöðvum til ársins 2003.

### 2003-2008

Frá árinu 2003 þar til nú hefur orðið mikil aukning nýrnaveikilífella í eldisstöðvum á Íslandi (Mynd 1.). Smit hefur greinst í laxi, bleikju og regnbogasilungi, bæði í keraeldi og í sjókvíum í alls 18 eldstöðvum, eða í um það bil helmingi stöðva með laxfiska í eldi. Að auki má leiða að því líkur að nýrnaveikifaraldur sem greindist í kvíaeldi á laxi í Færeyjum árið 2007 megi rekja til innflutnings smitaðra seiða frá Íslandi.

Í tilteknum faraldri má rekja nýrnaveikismit í 10 stöðvum til sumu uppsprettu. Þar var seiðum úr einni stöð dreift til annarra stöðva og þaðan til enn fleiri stöðva (Mynd 2). Þessi

faraldur hafði víðtækar

afleiðingar, og síðast árið 2007

eða meira en 3 árum síðar

greindist sýking í enn einni stöð

sem að líkum mátti rekja til sömu

uppsprettu. Annar faraldur, að því

er virðist ótengdur þeim fyrri,

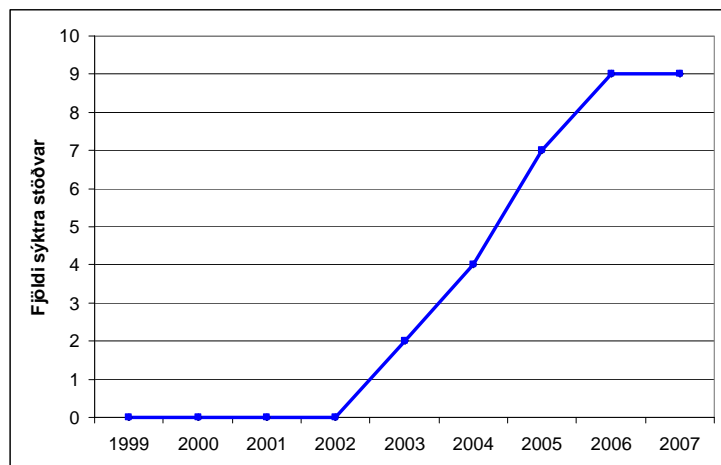
hófst árið 2005 og tengdust þá sex

stöðvar; sá faraldur olli einnig

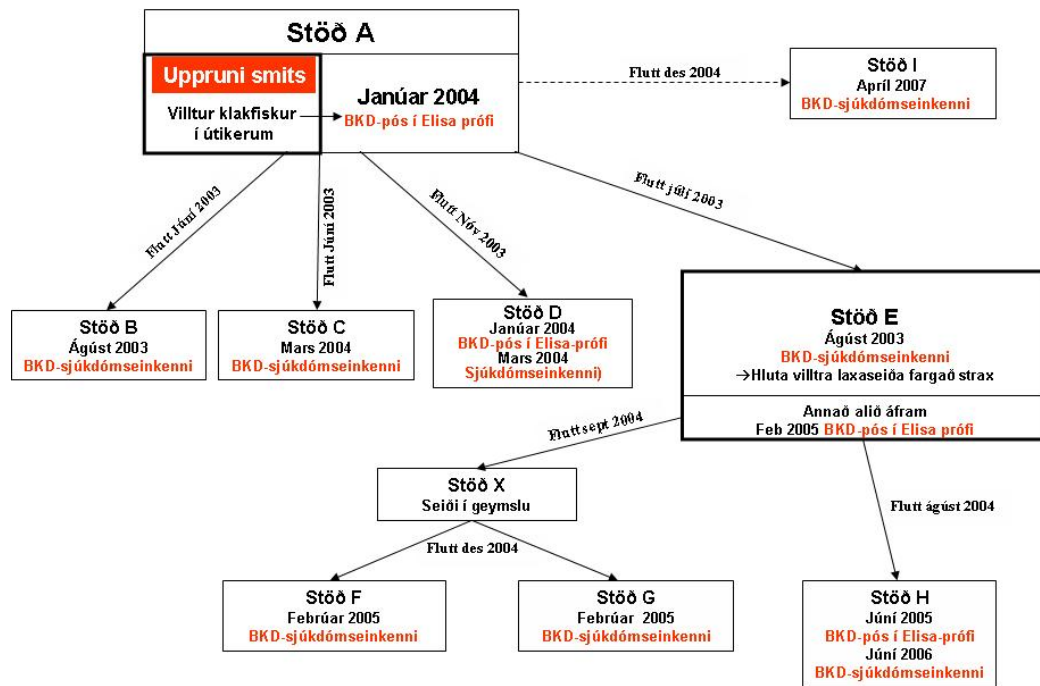
verulegu tjóni (Mynd 3). Önnur en

umfangsminni tilfelli hafa einnig

komið upp og óvissa um uppruna smitsins.

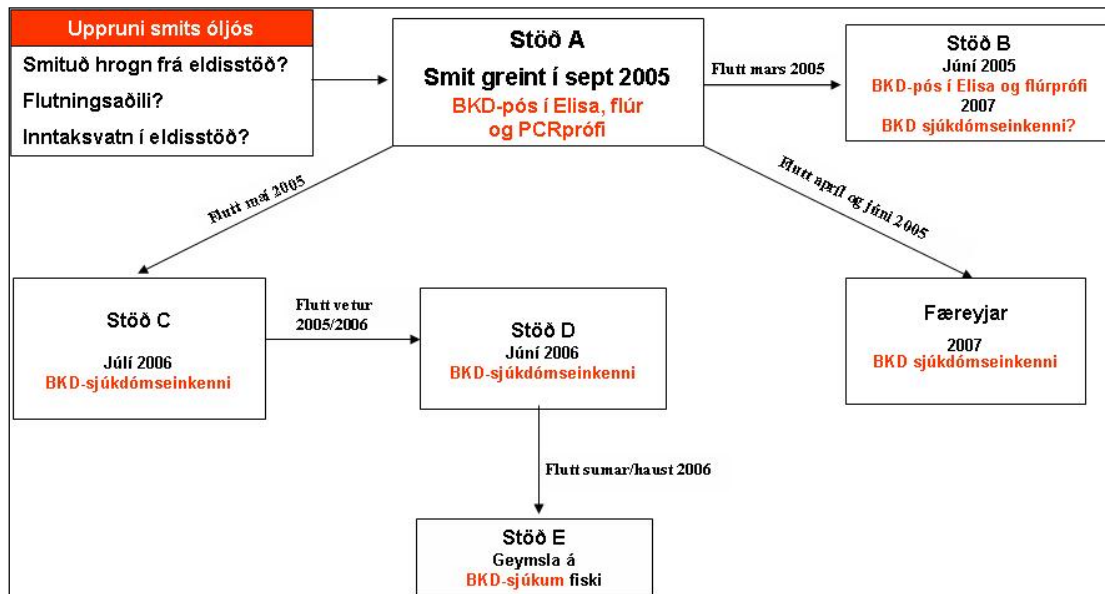


**Mynd 1.** Fjöldi eldisstöðva sem nýrnaveiki greindist í árin 1999-2007.



**Mynd 2.** Faraldsfræði nýrnaveikifaraldurs sem hófst árið 2003. Myndin sýnir eldisstöðvar sem komu við sögu, hvenær og hvert seiðahópar voru fluttir og hvenær stórsæ sjúkdómseinkenni komu fram.

Uppspretta smits og framvinda sýkinga er nokkuð mismunandi eftir eldisstöðvum svo og faröldrum. Í sumum tilfellum hefur tekist að rekja smitleiðir. Sjúkdómseinkenni hafa stundum komið fljótlega í ljós en dæmi eru þess að allt að 2-3 ár líði frá því að smit greinist fyrst þar til sjúkdómseinkenni koma fram. Í enn öðrum tilfellum hafa sjúkdómseinkenni aldrei komið fram þrátt fyrir að viðkomandi fiskahjörð hafi verið alin í 2-3 ár og smit greinst reglulega á tímabilinu. með mótéfnaprófi.



**Mynd 3.** Faraldsfræði nýrnaveikifaraldurs sem hófst árið 2005. Myndin sýnir eldisstöðvar sem komu við sögu, hvenær og hvert seiðahópar voru fluttir og hvenær stórsæ sjúkdómseinkenni komu fram.

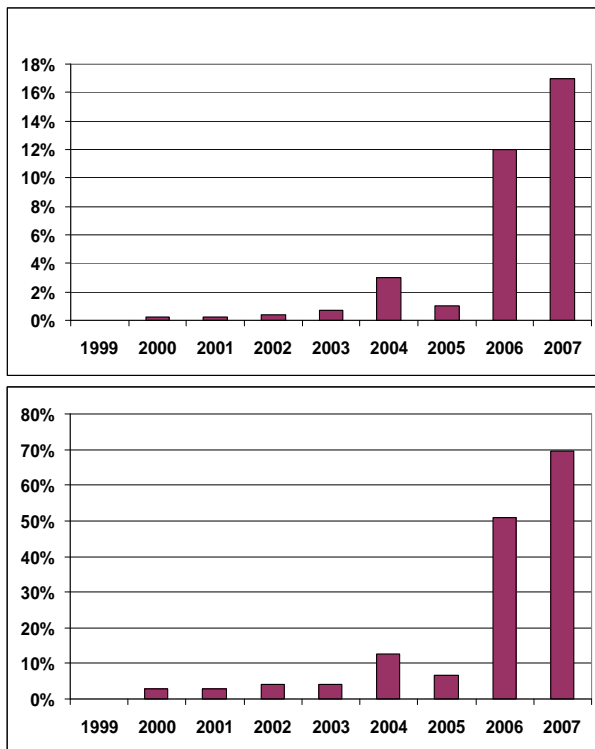
Ljóst er að nýrnaveiki hefur, ekki síst frá árinu 2003, hoggið stór skörð í fiskeldi á Íslandi. Fargað hefur verið milljónum eldisseiða og nemur tjónið hundruðum milljóna króna. Ekki sér fyrir endann á vandamálum tengum þessum sjúkdómi, því á síðasta ári greindist enn smit í níu eldisstöðvum (Mynd 1).

### Villtur klakfiskur til fiskiræktar

Um margra ára skeið hefur klakfiski úr fjölmörgum laxveiðám verið safnað til undaneldis. Frjóvguð hrogn þeirra eru klakin og alin í eldisstöð og þaðan sleppt, sumaröldum eða sem gönguseiðum í upprunaá. Þetta er gert í þeim tilgangi að styrkja laxastofna ána. Lögum samkvæmt skal skima villta klakfiska fyrir nýrnaveiki. Greinist smit er hrognum undan viðkomandi fiski fargað. Þó að ekki sé vitað um nýrnaveikifaraldra í náttúrulegum stofnum þá er varhugavert að sleppa nýrnaveikismituðum fiskum í vatnakerfí. Slíkt ráðslag yki að líkindum smittíðni í ánum sem torveldaði síðan val á smitfríum undaneldisfiski. Hér er því um að ræða augljóst hagsmunamál margra veiðifélaga og stangveiðimanna.

Eins og áður sagði hefur smittíðni nýrnaveikibakteríunnar jafnan verið lág í klaklaxi af villiuppruna. Síðustu ár hefur tíðni nýrnaveikismits hins vegar aukist til muna (Mynd 4). Árið 1999 greindist ekkert smit í villtum klaklaxi. Árin 2000-2005 var smittíðnin um eða innan við 1%, utan ársins 2003 er smit greindist í um 3% fiska. Haustið 2006 jókst smittíðnin upp í um

12% (20% sýna<sup>1</sup>) og nú í haust (2007) í u.þ.b 17% (29% sýna<sup>1</sup>). Fjöldi áa sem klaklaxi hefur verið safnað úr á undanförunum árum er á bilinu 40 – 60. Þar til haustið 2006, greindist einungis smit í fiskum einstöku áa, en árið 2006 greindist smit í um 51% áa (26 af 51 ám) og haustið 2007 í um 70% (39 af 56 ám). Af þessum sökum hefur þurft að farga gífurlegum fjölda hrogna síðastliðnar tvær klaktíðir.



**Mynd 4.** Smittíðni í villtum klakfiskum (t.v.) og hlutfall áa sem smit greindist í árin 1999-2007

Orsakir þessarar miklu aukningar smittíðni í villtum klakfiski má í nokkrum tilfellum rekja til sleppinga sýktra seiða; í allmörgum tilfellum eru orsakir enn óljósar. Ef til vill koma þar til að einhverju leyti náttúrulegar sveiflur í vistkerfinu.

## Umræða

Eftir að nýrnaveiki hafði valdið verulegu tjóni í fiskeldi á Íslandi árin 1985-1992 leið ríflega áratugur þar sem smit greindist einungis í stöku tilfellum, þá einkum í villtum klakfiski. Árið 2003 varð nýrnaveiki verulegt vandamál á ný og sér ekki fyrir endann á því.

Allt frá því skimun á villtum klakfiski hófst hér á landi hefur smittíðnin ávallt verið lág (0,5 – 3%). Haustið 2005 jókst smittíðnin verulega og greindist í um 12% fiska.

Síðastliðið haust, jókst tíðnin enn frekar og greindist þá í u.þ.b. 17% fiska, úr 39 af 56 ám sem klakfiski var safnað úr.

Ástæður ofanskráðs eru vafalaust margar, en ljóst er að hér hefur verið og er enn, mikill vandi á ferð og ljóst að nýrnaveiki er ennþá verulegt vandamál í eldi laxfiska á Íslandi. Frekari rannsóknir á smíti, smitleiðum og þróun sjúkdóms, ásamt endurskoðun verklagsreglna t.d. hvað varðar eldisferla, eftirlit og flutning, eru því brýn verkefni.

<sup>1</sup>Í flestum tilfellum eru sýni úr 2 fiskum skimuð í senn, þar af leiðandi verður alltaf ákveðin óvissa hve margir fiskar eru smitaðir, þ.e. báðir fiskar í sýni eða bara annar.