



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Norges Fiskerihøgskole

Varighet av immunresponser mot bakterieantigener hos vaksinert atlantisk laks i sjø – et feltstudie

Kristine Eikrem

Masteroppgave i Akvamedisin BIO-3955 (60 stp)

Mai 2024

Forord

Arbeidet presentert i denne oppgaven ble gjennomført på Norges Fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi ved Universitetet i Tromsø. Prøvematerialet ble hentet ut i perioden august 2022 - januar 2024. Oppgaven ble ferdigstilt i mai 2024.

Til å begynne med vil jeg takke min hovedveileder Tore Seternes for å ha introdusert meg for oppgaven. Takk for gode tilbakemeldinger og oppfølging gjennom hele prosessen. Jeg vil også rette en takk til min bi-veileder Marwa Mechlaoui for opplæring på lab med ELISA og Real-Time PCR. Jeg vil også takke Frida Tonning for eksepsjonell hjelp på histologilab. En takk rettes også til settefisk og matfiskanlegget samt fiskehelsetjenesten som gjorde det mulig for meg å ta del i denne oppgaven. Videre vil jeg også takke Guro Strandskog for alltid å ta seg tid til å slå av en prat og komme med nyttige tips og tilbakemeldinger. Jeg vil også takke Miroslava Hansen ved Veterinærinstituttet i Harstad for hjelp med gjennomføring immunhistokjemi.

Jeg vil rette en spesiell takk til min kjære medstudent Kristin Hamnvik, for et godt samarbeid under prøveuttak og lab. Alt arbeidet lagt ned på denne oppgaven hadde ikke gått like lett uten deg. Vil også rette en stor takk til mine fantastiske foreldre som støtter meg uansett hva. Takk Eirik for alle fine helger vi har hatt sammen og at du har dratt meg med ut i friskluft i masterskrivinga. Til slutt vil jeg også takke mine medstudenter for en morsom og minnerik studietid.

Tromsø, mai 2024



Kristine Eikrem

Sammendrag

Oppdrett av atlantisk laks er en stor næring i Norge i dag, men opplever problematikk med blant annet sykdom. Det arbeides med å utvikle gode og effektive vaksiner for å forhindre alvorlige sykdomsproblemer og opprettholde god fiskevelferd. For å kunne bidra til videre vekst i næringen er det derfor viktig å få en god forståelse for immunsystemet til fisk og undersøke vaksineresponser for å utvikle bedre og mer effektive vaksiner i fremtiden.

I dette forsøket ble atlantisk laks vaksinert med en sjukomponentsvaksine og fulgt 74 uker etter vaksinerings. Det ble tatt ut prøver i perioden august 2022 – januar 2024. Prøvematerialet ble brukt til å se nærmere på fiskevelferd og varighet av immunrespons etter vaksinerings. Det ble gjennomført Speilberg-score, ELISA, histologi, immunhistokjemi og Real-Time PCR. Det ble lagt vekt på bakterieantigener, og vaksinekomponentene *Vibrio anguillarum* og *Aeromonas salmonicida* ble undersøkt. I Real-Time PCR ble genuttrykket av mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas undersøkt.

Resultatene viste en økning i både lengde og vekt gjennom hele forsøket. Oversikt over dødelighet gjennom produksjonen viste to svingninger som korrelerte med påvist sykdom og avlusning. Vaksineinduserte sammenvoksinger ble observert i samtlige fisk, og Speilberg-score 3 var høyeste score gitt. Frem til 74 uker etter vaksinerings ble det observert en signifikant økning i antistoffrespons av undersøkte antigener sammenlignet med uvaksinert fisk. Vaksinegranulomer i tilknytning til injeksjonsstedet ble funnet frem til uke 22 etter vaksinerings. Vaksineantigener knyttet til injeksjonsstedet ble vist i uke 12, 16 og 22 etter vaksinerings. Det ble observert høyere genuttrykk av mIgM og sIgM i hodenyre sammenlignet med pankreas. I forbindelse med sykdom ble det en økning i genuttrykk i pankreas for både mIgM og sIgM. Dette indikerer en lokal IgM produksjon.

Forkortelser

ANOVA	Variansanalyse
APC	Antigenpresenterende celler
BCR	B-celle reseptor
BSA	Bovint serumalbumin
cDNA	Komplementært DNA
CMS	Cardiomyopatisyndrom
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTL	Cytotoksisk T-celle
dsDNA	Dobbeltrådig DNA
E α 1	Elongeringsfaktor alfa 1
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
gDNA	Genomisk DNA
HSMB	Hjerte- og skjelettmuskelbetennelse
IFN	Interferon
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
IgT	Immunglobulin T
IHC	Immunhistokjemi
ILT	<i>Interbranchial lymphoid tissue</i>
IPNV	Infeksiøs pankreasnekrose virus
LABVI	Laboratoriebaserte velferdsindikatorer
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mIgM	Membranbundet immunglobulin M
NCC	Ikke-spesifikke cytotoksiske celler
NK-celle	Naturlige drepeceller
OVI	Operative velferdsindikatorer
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PBST	Fosfatbufret saltvann med Tween 20
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PRR	<i>Pattern recognition reseptor</i>
SAV	Salmonid alfavirus
sIgM	Sekretorisk immunglobulin
ssDNA	Enkeltrådig DNA
TBS	Tris-bufret saltvann
TCR	T-celle reseptorer
Th-celler	T-hjelpeceller

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Norsk oppdrettsnæring	1
1.2	Vaksinering av norsk oppdrettsfisk.....	2
1.3	Immunsystemet	4
1.3.1	Immunologiske organer hos fisk	5
1.3.2	Medfødt immunitet.....	6
1.3.3	Adaptiv immunitet.....	7
1.4	Bakteriesykdommer	8
1.5	Fiskevelferd og utfordringer i dagens oppdrett	9
1.6	Formål	12
2	Materialer og metoder	13
2.1	Reagenser og utstyr	13
2.2	Prøvematerialer	13
2.2.1	Settefiskfase	13
2.2.2	Vaksinering	13
2.2.3	Sjøfase	13
2.2.4	Behandling	14
2.3	Prøveuttak.....	15
2.3.1	Oppbevaring	16
2.4	Analyser	17
2.4.1	Lengde og vekt	17
2.4.2	Speilberg-skala	17
2.4.3	ELISA.....	17
2.4.4	Histologi.....	20
2.4.5	Immunhistokjemi	22

2.4.6	Real-Time PCR	24
3	Resultater.....	30
3.1	Velferd.....	30
3.1.1	Lengde og vekt	30
3.1.2	Dødelighet	32
3.1.3	Speilberg-skala	33
3.2	ELISA.....	35
3.3	Histologi	37
3.3.1	Vaksinegranulomer	37
3.3.2	Immunhistokjemi	39
3.4	Real-Time PCR	42
4	Diskusjon.....	44
4.1	Velferd.....	45
4.1.1	Vekst.....	45
4.1.2	Dødelighet	47
4.1.3	Speilberg.....	48
4.2	Antistoffrespons - ELISA.....	50
4.3	Histologi	53
4.3.1	Vaksinegranulomer	53
4.3.2	Immunhistokjemi	53
4.4	Real-Time PCR	55
5	Konklusjon	57
6	Referanser.....	58
7	Vedlegg	68

1 Innledning

1.1 Norsk oppdrettsnæring

Pionerarbeidet i norsk akvakultur skjedde på 1970-tallet, og har vokst til en av landets største eksportnæringer økonomisk sett. Det drives hovedsakelig oppdrett på atlantisk laks (*Salmo salar* L.), men også regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* W.) og andre marine arter som torsk (*Gadus morhua* L.) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Taranger et al., 2015). Mye av norsk sjømat blir eksportert til utlandet og i 2023 ble det eksportert totalt 2,82 millioner tonn til en verdi på 171,7 milliarder kroner. Av dette kom 1,30 tonn fra havbruk med en verdi på 128,7 milliarder kroner. Dette året besto laks for 43,7 % av eksportert mengde og 71,3 % av den totale verdien (NorgesSjømatråd, 2024). Med dette er Norge i dag verdens største produsent av atlantisk laks (Iversen et al., 2020) og har siden 2004 vært verdens nest største eksportør av akvatisk mat, med Kina på førsteplass. EU er Norges desidert mest viktige marked, og står for 60 % av eksportverdien (FOU, 2022).

Norsk sjømat har et godt internasjonalt omdømme for sin høye kvalitet og bærekraftige produksjonsmetoder. For å kunne opprettholde dette omdømmet er det viktig å ha søkelys på blant annet bærekraft, kvalitetskontroll og videre innovasjon og forskning. Dagens oppdrett står ovenfor ulike utfordringer og ifølge Fiskehelse rapporten 2023 var det 62,8 millioner (16,7 %) laks som døde i sjøfasen av produksjonen dette året. Dette er det høyeste tallet døde individer som er registrert så langt i løpet av ett år (Sommerset, 2024). I de to seneste utgavene av Fiskehelse rapporten kommer det fram at i både 2022 og 2023 er tre helseproblemer som utmerker seg. Dette er skader ved avlusningsoperasjoner, kompleks gjellesykdom og vintersår (Sommerset, 2023, 2024).

Det vil bli økende etterspørsel etter sjømat i fremtiden, og Norge står i særklasse for å kunne ekspandere og møte dette behovet med sine naturlige fortrinn og opparbeidet kunnskap og industri (Olafsen et al., 2012). Videre vekst i lakseproduksjon forutsetter at det jobbes for å begrense blant annet miljøpåvirkning og sykdommer, og utvikling av nye og forbedrede vaksiner er nødvendig. Siden utbredelsen av flerkomponents stikkvaksiner med oljeadjuvans på 1990-tallet, har situasjonen rundt bakterielle sykdommer vært nokså god (Brun et al., 2023).

1.2 Vaksinerings av norsk oppdrettsfisk

På bakgrunn av utviklingen i norsk oppdrettsnæring ble det i tidsperioden 1985-1995 brukt store ressurser på utvikling av vaksiner til oppdrettsfisk (Bøgwald & Dalmo, 2020). I denne perioden så næringen alvorlige sykdomsproblemer, og antibiotika var eneste tilgjengelige behandling. Dermed var antibiotikaforbruket meget stort, med en topp på omtrent 50 tonn i 1987 (Berg, Bergh, et al., 2006).

Det som danner basis for vaksinasjon er immunsystemets evne til å huske og gjenkjenne en mikrobe eller antigen, slik at den ved senere anledning kan gjenkjenne og gi en kraftigere og mer spesifikk immunrespons mot samme patogen (Press & Jørgensen, 1999). Gjennom regelverk har man i dag en plikt til å gjennomføre relevante smitteforebyggende tiltak, herunder vaksinerings (Sommerset et al., 2024b).

Vaksinerings i Norge skjer stort sett før fisken flyttes over fra ferskvann til sjøvann (Nielsen et al., 2023). I dag finnes det ulike metoder for å vaksinere fisk, der man kan benytte dypp, bad, oralt via fôr eller injeksjon. Bad og dyppvaksinerings brukes gjerne når fisken er for liten til å kunne få en injeksjonsvaksine. Ved bad og dyppvaksinerings, også kaldt immersjonsvaksiner, blir vaksineløsningen fortynnet i vannet der fisken oppholder seg. Ved bad oppholder fisken seg i lengre tid i løsningen, men med en mindre konsentrasjon, Ved dypp er konsentrasjonen høyere, men fisken holdes i løsningen i kortere tid (Bøgwald & Dalmo, 2019). Disse metodene baserer seg på at antigener blir tatt opp via tarm, gjeller og hud (Bøgwald & Dalmo, 2020). Ved bruk av immersjonsvaksiner er det ofte at fisken får en booster dose for å øke beskyttelsen. Likevel er det vist lav til moderat effekt av denne type vaksinerings i de fleste tilfeller (Bøgwald & Dalmo, 2019). Ved oral vaksinasjon får fisken vaksinen gjennom fôret, men en begrensning i denne metoden er forskjell i appetitt hos individer og vil føre til ulik vaksinedose fra fisk til fisk (Dalmo et al., 2016). Vanligste metode for vaksinerings er injisering direkte i bukhulen, også kalt intraperitoneal administrasjon. Dette vil vanligvis gi god immunrespons og beskyttelse, men kan ofte føre til bivirkninger i form av sammenvoksinger og pigmentering i bukhulen (Bøgwald & Dalmo, 2020). Injeksjon i bukhulen er arbeidskrevende og fører til stress for fisken, men er nødvendig for at enkelte antigener, for eksempel mot furunkulose, skal ha tilfredsstillende effekt (Berg, Bergh, et al., 2006).

I dag vaksineres fisk mot mange bakterielle sykdommer, samt mot noen få sykdommer forårsaket av virus (Bøgwald & Dalmo, 2020). Vaksinene som brukes er ofte multivalente og inneholder antigener fra flere forskjellige bakterier og virus. Dermed får fisken beskyttelse mot flere sykdommer i samme vaksine (Poppe & Koppang, 2014).

For fisk er det hovedsakelig fire forskjellige typer vaksiner: Inaktiverte, attenuerte, rekombinante og DNA-vaksiner. I dag er norsk akvakultur avhengig av inaktiverte vaksiner som fremstilles ved dyrking av den ønskede patogene mikroorganismen, for deretter å inaktivere den med formalin (Berg, Bergh, et al., 2006). Ved bruk av rekombinante antigener og inaktiverte patogener i vaksiner er disse ofte ikke i stand til å gi tilstrekkelig beskyttelse i seg selv, og trenger derfor et «hjelpstoff» slik som adjuvanser og immunstimulerende midler for å øke effekten (Tafalla et al., 2013). For vaksine mot *Aeromonas salmonicida* er det nødvendig å emulgere suspensjonen med drepte bakterier i olje for å kunne få en tilfredsstillende effekt. Adjuvansen vil bidra til jevn frigivelse av antigenene over tid og forsterker effekten (Herbert, 1968). Et slikt hjelpstoff kan være med å forårsake bivirkninger av varierende alvorlighetsgrad (Poppe & Koppang, 2014). Vanlige observerte bivirkninger av vaksiner kan være immunreaksjoner og sammenvoksinger, melanindeponering, vekstreduksjon og skjelettdeformasjoner (Berg, Bergh, et al., 2006).

Attenuerte vaksiner består av levende mikroorganismer som har svekket virulens eller naturlig lav virulens. Patogener kan svekkes ved blant annet genetisk manipulasjon (Ma et al., 2019). Slike vaksiner ville i mange tilfeller hatt god effekt, men enkelte sikkerhets spørsmål må vurderes. Dette kan innebære risiko for at de attenuerte mikroorganismene går tilbake til virulens eller potensiale for kontaminering med uønskede organismer (Frey, 2007).

Det finnes i dag ingen tilgjengelige attenuerte vaksiner til fisk i Norge, men benyttes i blant annet USA (Shoemaker et al., 2009).

Rekombinante vaksiner modifierer den patogene mikroorganismen. Man kan isolere gener som er med på å fremkalle en immunrespons, og fjerne de patogene genene som koder for virulensfaktorer. Disse patogene genene kan videre klones inn i vektorer slik som *Escherichia coli* og dyrkes videre i medier (Madigan et al., 2012). Per i dag er den eneste kommersielt tilgjengelige rekombinante vaksinen til bruk på fisk en vaksine mot IPN (Berg, Bergh, et al., 2006).

DNA-vaksiner benytter seg av fragmenter av genomet til patogenet eller spesifikke gener som koder for immunogene proteiner. Disse blir klonet i plasmider eller virale vektorer, som deretter blir injisert i muskelceller (Madigan et al., 2012). Når dette blir tatt opp av fiskens egne celler vil de selv produsere de ønskede antigenene som aktiverer en immunrespons (Restifo et al., 2000). Det finnes i dag en DNA-vaksine som brukes i Norge mot PD (pankreassykdom) (Thorarinsson et al., 2021).

I 2023 fikk en ny en-komponents vaksine mot *Moritella viscosa* markedsføringstillatelse i Norge. Denne inneholder en såkalt variant *M. viscosa* antigen, og gis i tillegg til den «gamle» varianten som er en del av den generelle vaksinen som blir gitt (Sommerset et al., 2024a)

1.3 Immunsystemet

Immunsystemet er et forsvarssystem mot patogener og består av organer, celler og løselige faktorer. Det kan deles opp i medfødt immunitet og adaptiv immunitet. Medfødt immunitet spiller en viktig rolle i å hindre fremmede mikrober og substanser til å trenge inn i individet. Hos fisk vil dette blant annet bestå av skjell, slimhinner og hud (Haugland, 2020). Når patogener trenger gjennom førstelinjeforsvaret og inn i sirkulasjonssystemet, blir de enten tatt opp av fagocytterende celler, eller blir transportert til de sekundære lymfoide organene milt og hodenyre der det adaptive immunsystemet starter jobben (Press & Jørgensen, 1999).

Beinfisk (Teleostei) har ikke lymfeknuter og beinmarg slik som pattedyr, men har lymfoide organer som milt, hodenyre, thymus og diffust lymfoid vev i tarmslimhinnen (Press & Jørgensen, 1999; Roberts, 2012). Det er i nyere tid gjort funn i laksens lymfatiske organ der det ble oppdaget interbrankialt lymfoid vev (ILT) og laksens bursa. Dette understreker at det fortsatt er mye som er ukjent, og det finnes fremdeles viktige spørsmål rundt fiskens immunsystem som ikke er besvart (Bjørngen & Koppang, 2020). Det er i de primære lymfoide organene at dannelse og modning av leukocytter skjer, og hos fisk kan leukocytter morfologisk deles inn i granulocytter, monocytter/makrofager og lymfocytter (Press & Jørgensen, 1999). Leukocytene er fiskens forsvar mot infeksjoner, og det fins medfødte og adaptive systemer (Kryvi & Poppe, 2021). Det meste man vet i dag om immunsystemet har man fått ved å studere mus og mennesker (Bassity & Clark, 2012). Hos beinfisk er alle komponentene som regnes med i det medfødte og adaptive immunforsvaret blitt påvist

(Lieschke & Trede, 2009). Det er derimot forskjeller når det kommer til organer, der thymus, hodenyre og milt spiller en viktig rolle hos fisk.

1.3.1 Immunologiske organer hos fisk

Thymus er et viktig og unikt organ hos vertebrater, og er ansvarlig for modning og produksjon av T-celler (Bowden et al., 2005). Hos alle kjevemunner er thymus vanligvis det første lymfoide vevet som utvikles under embryoutvikling (Hansen & Zapata, 1998). Thymus er lokalisert dorsalt under gjellelokket, og er skilt fra det ytre vannmiljøet ved kun et enkelt epitelcellelag (Press & Evensen, 1999). Det er vist ansamlinger av T-celler i thymus, milt og gjellelokaliserte ILT. Det er også funnet rikelig med T-celler i epitelet i tarm, men ellers i ikke-lymfoide organer er tilstedeværelsen av T-celler begrenset (Koppang et al., 2010).

Nyren er lokalisert mellom ryggraden og svømmeblæren, og strekker seg langs nesten hele kroppshulen. I nyre produseres det både erytrocytter, granulocytter og monocytter (Kryvi & Poppe, 2021). I fremre del ligger hodenyren som består utelukkende av hematopoetisk og lymfoid vev (Bruno et al., 2013a). Hodenyren har morfologiske likheter med beinmarg, og regnes som et bloddannende organ (Kaattari & Irwin, 1985). Det er et av de primære lymfoide organene hos beinfisk (Hansen & Zapata, 1998), og er viktig for både T- og B-celle dannelse. (Kryvi & Poppe, 2021). Modning av B-celler skjer i hodenyren, som videre sendes ut i sirkulasjonen og kan lokaliseres videre i baknyre eller milt (Irwin & Kaattari, 1986). Her vil de kunne aktiviseres av antigenpresenterende celler (APC) og også muligens T-celler, som fører til differensiering til plasmablaste og plasmaceller. Plasmaceller kan bli transportert tilbake til hodenyren som hukommelsesceller og gi langvarig immunitet (Zwollo et al., 2005). Hodenyre fungerer også som et sekundært lymfoid organ og er viktig i å initiere responser ved infeksjon (Kaattari & Irwin, 1985; Press & Evensen, 1999).

Milt er et sekundært lymfatisk organ, og filtrerer perifert blod (Bjørngen & Koppang, 2021). Milt virker å ha en viktig rolle særlig i produksjon av leukocytter, og tradisjonelt regnes milt som et sekundært lymfatisk organ (Kryvi & Poppe, 2021).

1.3.2 Medfødt immunitet

Det medfødte immunsystemet er fiskens første naturlige forsvar mot patogener, og er ikke spesifikt. Det medfødte immunsystemet deles inn i fysiske barrierer, cellulære og humorale komponenter. Aktiviteten til det medfødte immunsystemet påvirkes av eksterne og interne faktorer slik som temperaturendringer og stress som kan nedregulere effekten av medfødte parametere (Magnadóttir, 2006). En viktig del av det medfødte immunsystemet er fagocytose.

Fysiske barrierer slik som hud og slim er viktige i fiskens immunforsvar fordi de er første interaksjon mellom verten og patogener. Det finnes mange enzymer og antimikrobielle proteiner innenfor disse lagene som antas å være en del av det medfødte immunsystemet til fisk (Dalmo et al., 1997; Ingram, 1980). Dette kan være lysosomer og proteaser (Fast et al., 2002). Cellulære komponenter består i stor grad av leukocytter kalt myeloide celler, som fagocytterer og ødelegger patogener. Humorale komponenter består blant annet av cytokiner, antimikrobielle peptider og komplementproteiner (Jørgensen, 2014).

Ved vaksinerer entrer vaksinekomponentene innsiden av fisken uten eksponering for de fysiske barrierene. Granulocytter og makrofager infiltrerer området. Det vil kunne bli en inflammatorisk respons der immunsystemet frigjør inflammatoriske mediatorer for å mobilisere immunceller til området for å bekjempe infeksjonen. Dette kan være ulike typer cytokiner slik som interleukiner og interferoner (IFN) som fungerer som signalstoffer i immunsystemet (Secombes et al., 1999; Van Muiswinkel & Nakao, 2014).

Det medfødte immunsystemet gjenkjenner fremmede objekter, og starter en respons mot disse. Ved hjelp av PRR (*pattern recognition reseptor*) kan de cellulære og humorale komponentene gjenkjenne fremmede patogener og binde til PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) på patogenene (Magnadóttir, 2010). Patogenene kan dermed bli fagocyttert og tilintetgjort. Viktige fagocytiske celler i fisk er nøytrofiler og makrofager. Nøytrofiler er en type granulocytter som finnes i både nyre, milt og sirkulasjonssystemet, og er de første cellene som migrerer til betennelsesstedet (Roberts, 2012; Secombes & Wang, 2012). Det er også funnet celler med lignende egenskaper som dendritiske celler hos pattedyr i regnbueørret. Hypotesen er at disse også fungerer som APC i fisken som binder sammen det medfødte og adaptive immunforsvaret (Bassity & Clark, 2012). Ikke-spesifikke cytotoxiske

celler (NCC) og NK-lignende celler (naturlige dreperceller) har blitt observert å inneha lignende egenskaper som NK-celler hos pattedyr (Jørgensen, 2014).

1.3.3 Adaptiv immunitet

Etter at det medfødte immunsystemet har detektert og respondert på patogener eller vaksineantigener vil den adaptive immunresponsen starte. Det adaptive immunsystemet har både humorale og cellulære responser (Abós et al., 2022). Det adaptive immunsystemet blir stimulert ved eksponering av antigener. B- og T-celler aktiveres ved binding til MHC klasse 1 og 2 (*major histocompatibility complex*) på overflaten av cellene eller ved immunglobuliner. I laks er det blitt identifisert både MHC klasse 1 og 2 (Grimholt et al., 1993).

Den humorale responsen medieres av B-celler (Abós et al., 2022). Antigenopptaket fører til aktivering av B-celler som differensierer til plasmaceller, som begynner å produsere og skille ut antistoffer eller hukommelses B-celler som er spesifikke for antigenene i vaksinen (Secombes & Belmonte, 2016). Disse antistoffene blir også kalt immunglobuliner, og kan være i sekretorisk form eller membranbundet form. De sekretoriske immunglobulinene vil sirkulere i fiskens sirkulasjonssystem og kan binde seg til antigener på overflaten av patogener. Når antistoffene binder seg til patogenet kan de markere det for destruksjon av andre deler av immunsystemet eller blokkere dets evne til å infisere celler (Secombes & Belmonte, 2016). Immunglobulinene setter i gang den adaptive immuniteten, som involverer B- og T-lymfocytter (Makesh et al., 2022). De fleste beinfisk har tre klasser av immunglobuliner. IgM er den dominerende klassen, og finnes særlig i blod og vevsvæsker. IgT finnes i slimlag, og kan ved infeksjon oppreguleres kraftig i mukusvev. IgD er mindre kjent men det tyder på at denne også har en funksjon i slimlag (Hordvik, 2020).

Den cellulære responsen består av T-celler. T-celle reseptorer (TCR) binder seg til antigener som er behandlet og presentert på MHC (Abós et al., 2022). T-celler spiller en viktig rolle i å drepe infiserte celler og regulere immunrespons. De kan bidra med å bekjempe smittestoffer som infiserer celler direkte. T-celler består hovedsakelig av T-hjelperceller (Th-celler) og cytotoksiske T-celler (CTL). CTL er spesialiserte T-celler som kan drepe celler som er infisert med patogener, og begrense spredning. Th-celler bidrar til å aktivere andre immunceller, deriblant B-celler (Abós et al., 2022).

Etter at immunsystemet er blitt eksponert for vaksineantigener eller patogener vil noen av B- og T-cellene forbli i fisken som hukommelses celler. Ved en senere infeksjon med samme antigen vil disse kunne mobilisere en raskere, mer spesifikk og mer effektiv immunrespons (Secombes & Belmonte, 2016). Ved bruk av vaksiner hos fisk utnytter man dermed dette systemet og «trener» immunsystemet for eksponering av patogener senere.

1.4 Bakteriesykdommer

Bakteriesykdommer som tidligere var de mest alvorlige sykdommene i norsk oppdrettsnæring, slik som kaldtvannsvibriose (*Vibrio salmonicida*), klassisk vibriose (*Vibrio anguillarum*) og klassisk furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) er det i dag utviklet vaksiner som gir effektiv beskyttelse mot (Bøgwald & Dalmo, 2020).

Vibrio anguillarum

V.anguillarum er årsaken til klassisk vibriose. Dette er en dødelig sykdom som rammer forskjellige marine og fersk-/brakkvannsfisk. Det er blitt gjennomført betydelig forskning på denne bakterien på grunn av alvorlighetsgraden og utbredelsen av denne sykdommen (Frans et al., 2011). Det fins ulike serotyper av *V.anguillarum* og særlig O1 og O2 er dominerende. O1 er den mest vanlige forekommende serovarianten hos laksefisk, men O2 forekommer også hyppig (Larsen & Pedersen, 1999). Vaksinasjon av fisk mot vibriose er en av de mest vellykkede utviklingene innen sykdomsforebygging i moderne akvakultur (Colquhoun & Lillehaug, 2014). Sporadiske tilfeller forekommer fortsatt i oppdrett, men i 2023, og forekommer gjerne ved høye vanntemperaturer (Garseth et al., 2024).

Aeromonas salmonicida

A.salmonicida forårsaker furunkulose i hovedsakelig laksefisk i ferske og marine miljø. Bakterien blir klassifisert som typisk eller atypisk basert på opprinnelsen til isolasjon. *A.salmonicida* subs. *salmonicida* er den eneste typiske underarten, og er isolert fra laksefisk (Dallaire-Dufresne et al., 2014; Wiklund & Dalsgaard, 1998). *A.salmonicida* subs. *salmonicida* er en meldepliktig sykdom, og har de siste årene bare forekommet sporadisk i Norge (Gulla, 2024).

Selv om vi i dag har gode vaksiner mot alvorlige bakteriesykdommer hos laksefisk, er det fortsatt noen bakterielle infeksjoner som skaper utfordringer. Selv om vi i dag har effektive vaksiner mot disse alvorlige bakteriesykdommene, er det er derimot andre sykdommer

grunnet bakterier som det fortsatt ikke er utviklet tilstrekkelige vaksiner mot. I dagens oppdrett av atlantisk laks er det vintersår (*M.viscosa/Tenacibaculum* spp) som gir flest velferdsutfordringer i sjø. Dette er ikke en meldepliktig sykdom, og nøyaktige tall på forekomst finnes dermed ikke (Gulla, 2024).

1.5 Fiskevelferd og utfordringer i dagens oppdrett

Det er de senere årene blitt satt mer fokus på fiskevelferd. Forbrukerne stiller større krav og det å kunne vise til god velferd er viktig for næringen og hver enkelt aktør. For oppdretter vil det være av økonomisk interesse også, da god velferd vil kunne føre til mer effektiv og lønnsomt oppdrett, med bedre vekst og filet av god kvalitet (Read, 2008). Det er også lovverk som regulerer og setter krav til dyrehold. Dyrevelferdsloven fastslår at dyr skal behandles godt og beskyttes mot unødige påkjenninger og belastninger. Den fremmer god dyrevelferd og respekt for dyr og viser til at dyr har egenverdi uavhengig av nytteverdi for oss mennesker (Dyrevelferdsloven, 2009). De viktigste tiltakene for å forbedre fiskevelferden fremover vil være bedre tilnærming til biosikkerhet og forebyggende tiltak mot lakseluspåslag samt reduksjon i dødelighet knyttet til avlusning (SjømatNorge, 2023).

Velferd er komplekst og kan være vanskelig å definere da det blir brukt forskjellig basert på mennesker fra ulike bakgrunn (Huntingford & Kadri, 2008). De fleste definisjoner vil kunne plasseres inn under en av følgende kategorier: Følelse, funksjon og natur (Huntingford et al., 2006). En enkelt indikator på velferd er ikke tilstrekkelig alene, men det er noe uenighet i hvilke ulike indikatorer som bør settes sammen og prioriteres for best mulig mal for god velferd (Dawkins, 1998). Følelsesbaserte indikatorer baserer seg på den subjektive opplevelsen til dyret, der den skal føle seg vell og ikke bli utsatt for negative opplevelser slik som smerte eller frykt. Funksjonsbaserte indikatorer baserer seg på evnen et dyr har til å tilpasse seg det miljøet den er i, og naturbaserte indikatorer baserer seg på at dyret er i stand til å leve et naturlig liv og kunne utøve sin naturlige atferd (Huntingford et al., 2006).

Velferdsindikatorer brukes til å få en indikasjon på hvorvidt fisken får oppfylt sine velferdsbehov eller ikke. Slike indikatorer kan være direkte observasjoner av helse, fysiologiske indikatorer og adferd, eller indirekte indikatorer slik som miljø, tilgjengelige ressurser og appetitt (Duncan, 2005; Nilsson et al., 2017). Operative velferdsindikatorer (OVI-er) er praktiske og lett definerte, og kan brukes i den daglige driften på anlegget (Noble

et al., 2012), mens laboratoriebaserte velferdsindikatorer (LABVI-er) krever at prøver blir sendt inn til et laboratorium for videre bearbeiding (Nilsson et al., 2017).

Dyrebaserte velferdsindikatorer

Dyrebaserte velferdsindikatorer deles inn i gruppebaserte og individbaserte. Gruppebaserte velferdsindikatorer kan være dødelighet, adferd, appetitt og vekst mens individbaserte velferdsindikatorer kan være lakselus, kjønnsmodning, ryggdeformiteter og vaksinerelatert patologi (Nilsson et al., 2020).

Vekst påvirkes av ulike faktorer slik som ernæring, sykdom, vannkvalitet og kronisk stress. Ved å analysere forholdet mellom lengde og vekstdata vil man kunne indikere fiskens tilstand. Man vil anta at tyngre fisk av en gitt lengde har bedre velferd (Bolger & Connolly, 1989). På grunn av at vekst kan bli påvirket av faktorer som ikke er relatert til velferd, bør den derfor ses i sammenheng med andre faktorer slik som stress og sult (Ellis et al., 2002; Turnbull et al., 2005).

Dødelighet er den mest brukte velferdsindikatoren (Gismervik et al., 2024). Dette er en grov indikator, men man kan anta at høy dødelighet er et tegn på dårlig velferd og at fisk som dør i løpet av produksjonen har opplevd en viss grad av dårlig velferd før de døde (Grefsrud et al., 2023). Dødelighet vil være en indikator på sykdom, dårlige miljøforhold, skader og andre forhold som er relatert til redusert velferd (Stien et al., 2013).

En individbasert velferdsindikator som kan brukes for å anslå alvorlighetsgrad og velferdsproblem knyttet vaksinerer er Speilberg-score. Denne metoden ser på grad av vaksinebivirkninger og evalueres i henhold til skalaen utviklet av (Midtlyng et al., 1996). Bivirkningene som ses skyldes ofte adjuvansen som brukes i vaksinene. Denne er nødvendig for langvarig virkning av vaksinen, og forholdet mellom effekt og bivirkning prøves å optimaliseres så godt som mulig (Nilsson et al., 2020). Fordeler med Speilberg-score er at den er enkel, rask og billig å bruke, men har også svakheter ved at man må avlive fisken og ved lite erfaring eller mangel på opplæring vil kunne vurdere lesjonene subjektivt (Nilsson et al., 2020).

Miljøbaserte velferdsindikatorer

Miljøet fisken lever i kan si noe om velferden, og kan også være en indikator som kan gi oppdretter en forvarsel på forverrede eller uoptimale forhold, og tiltak kan iverksettes hvis mulig (Stien et al., 2020). Miljøbaserte velferdsindikatorer er blant annet temperatur, oksygen og pH. Optimal temperatur for laks varierer med ulike stadier (Kolarevic et al., 2017). I merden måles vanntemperatur daglig ved ulike dyp, og laks har en preferanse for stigende temperaturer opp mot ca. 16 °C. Siden laksen er vekselvarm, vil temperatur ha en stor innvirkning på blant annet fysiologi og stoffskifte (Nilsson et al., 2022). Optimal temperatur for vekst er blitt regnet ut til å være 13 °C (Handeland et al., 2003). Det er registrert atferdsmessige termoreguleringer hos laksefisk, der fisken velger varmere eller kjøligere vann for å kontrollere indre kroppstemperatur (Oppedal et al., 2011).

1.6 Formål

Atlantisk laks er en av de viktigste artene det drives oppdrett på i Norge i dag. Bakterier, virus og parasitter er i dag med på å begrense videre vekst i norsk lakseoppdrett, og fører til utfordringer med fiskevelferd og økonomi. Vaksinerer er derfor et meget viktig forebyggende tiltak for å forhindre sykdomsutbrudd, og er også med på å sikre en sunnere og mer bærekraftig oppdrettsnæring.

Hovedmål

Følge vaksinert atlantisk laks i sjø inntil 74 uker etter vaksinerer for å observere fiskevelferd og varighet av immunresponser mot bakterieantigener.

Delmål

- 1) Følge utvikling av fiskevelferd ved å se på vekst, dødelighet og Speilberg-score.
- 2) Studere antistoffmengder i blod og se om denne endrer seg gjennom forsøksperioden.
- 3) Studere histologiske endringer i form av vaksinegranulomer i fettvev, milt og pankreas.
- 4) Påvise tilstedeværelse og lokalisering av vaksineantigener ved bruk av immunhistokjemi.
- 5) Analysere immunologisk genuttrykk av mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas ved bruk av Real-Time PCR.

2 Materialer og metoder

2.1 Reagenser og utstyr

Oversikt over reagenser er listet i Vedlegg 1. Utstyr som ble benyttet er nevnt under hvert delkapittel.

2.2 Prøvematerialer

Prøvematerialet ble hentet ut i perioden august 2022 – januar 2024. Den fulgte fiskegruppen ble produsert som 0-åring, og satt ut i sjøen 18.10.22 med en snittvekt på 112,2 gram. Fisken ble vaksinert uke 33, 18-21 august 2022.

2.2.1 Settefiskfase

Klekkeriet hadde en gjennomsnittstemperatur på 7 °C. Det ble rapportert om lav dødelighet og fine bakker. Det var jevn størrelse på yngel og plommesekk, og lite deformiteter. Det ble registrert en økning i andel deformiteter etter en stund, og det ble startet utplukking av yngel med plommesekkvatersott (oppsamling av vann i plommesekken). Ved helsebesøk i februar 2022 var det lav dødelighet, og fisken ble flyttet over til startforing i uke 8. Resterende avdelinger hadde en snitttemperatur på 12 °C. 24-timers lys ble brukt. Smoltifisering ble satt i gang etter vaksinering, ved bruk av gradvis økning i salinitet opp til 14 ppt (brakkvann) og fullt lys.

2.2.2 Vaksinering

Fisken som ble fulgt i forsøket ble vaksinert intraperitonealt med 1 dose ALPHA JECT Micro7 ILA, med 1 dose = 0,05 ml. Ved vaksinering hadde fisken en snittstørrelse på 50 gram og vannet en temperatur på 12 °C. Vaksinemaskinen som ble brukt var fra Maskon (VX-16). Vaksinen besto av inaktivert *Aermonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Listonella anguillarum* serotype O1, *Listonella anguillarum* serotype O2a, *Vibrio salmonicida*, *Moritella viscosa*, infeksiøs pankreasnekrose virus serotype Sp og infeksiøs lakseanaemi virus, samt flytende parafin, sorbitanoleat, polysorbat 80 og rensset vann (PHARMAQ, 2020).

2.2.3 Sjøfase

Ved utsett i sjø var det allerede seks merder på anlegget med god fiskehelsestatus. Det ble brukt lys første vinter i sjø. Etter utsett i sjø var appetitten noe lavere enn forventet. Ved fiskehelsebesøk i januar 2023 ble det rapportert om rundt 200 svimere, og fisken ble screenet

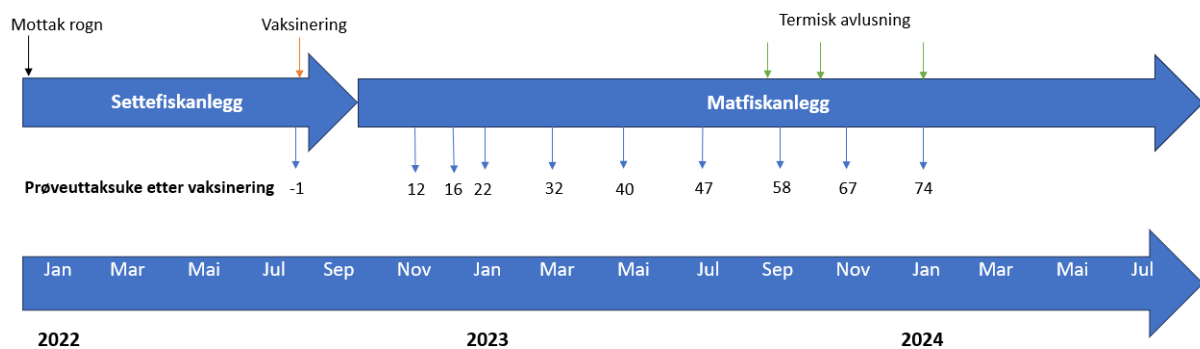
for IPNV (infeksiøs pankreasnekrose virus), hvor omtrent samtlige prøver ble IPNV-positive. Videre ble det rapportert om høyt innslag av avvikende fisk i merden, og noe høyere dødelighet på grunn av mye dårlig vær. I mai 2023 ble fisken diagnostisert med HSMB (hjerte- og skjelleltmuskel betennelse). I august 2023 rapporteres det om forøket dødelighet i fulgt merd, og fisken viser tegn til hoppeskader i form av hjerneblødning, samt hjerterelatert sykdom (HSMB). Ved obduksjon er det gjort funn av fisk med bleke organpakker. Parvicapsulose ble diagnostisert på anlegget, men ikke påvist på fulgt fiskegruppe. Det ble også gjort funn av CMS (cardiomyopatisyndrom) i fisk i en annen merd.

2.2.4 Behandling

Fisken ble behandlet med SLICE oppstart 07.11.22 (Emamectinbenzoat (mg/g)/Slice® Vet.). Det var lav dødelighet på lokaliteten, og god kontroll på lusetall. I uke 50, 60 og 74 etter vaksinerings ble fisken behandlet med thermolicer. Det ble rapportert om milde til moderate sår etter avlusning relatert til mekaniske skader. Ved helsebesøk januar 2024 rapporteres det om snutesår og sår/begynnende sårutvikling i hovedsak på flanken. Noe fisk viser tegn til beiteskader bak fettfinne eller ryggfinne. Etter avlusning gikk dødeligheten opp. I forbindelse med håndtering, ble fisken ikke holdt i samme merd gjennom hele produksjonssyklusen.

2.3 Prøveuttak

Figur 1 viser en oversikt over den fulgte fiskegruppen fra mottak av rogn til 15 måneder i sjø. Tidspunkt for vaksinerings og prøveuttak er presentert. Det ble totalt gjennomført 10 uttak, med første prøveuttak før vaksinerings i august 2022 (-1). Videre prøveuttak fant sted etter utsett i sjø med et intervall på ca. 4 uker frem til januar 2023, der man fortsatte med et intervall på ca. 8 uker mellom hvert uttak. Oversikt over uttak med eksakte datoer er lagt ved i Vedlegg 2. Det ble tatt ut vevsprøver til histologi og RNA-later, samt blodprøver ved alle uttak etter utsett i sjø. Det ble også tatt bilder til velferdsscoring og notert lengde og vekt, med unntak av uttak 12 på grunn av dårlig vær.



Figur 1 Oversikt over den fulgte fiskegruppen ved anlegget fra mottak av rogn til 15 måneder i sjø. Tidspunkt for vaksinerings er markert med oransje pil. Prøveuttak er markert med blå pil og er angitt i uker etter vaksinerings. Det er også anvist tilsvarende måned og år.

Ved uttak -1 på settefiskanlegget før vaksinerings ble det tatt ut blodprøver av 9 individer (n=9) fra kar 1, 5 og 9 i PV1. Fisken ble tatt opp ved bruk av avkastnot som ble senket ned mellom karvegg og sentersil, før raskt opptrekk. Det ble brukt håv til å plukke ut antall fisk til prøveuttak. Fisken ble lagt i en bømte med overdose finquel (Intervet International B.V., Nederland). På sjølokaliteten ble det tatt ut 20 individer (n=20) ved hvert uttak. Alle ble avlivet med overdose benzokain (ACD Pharmaceuticals AS, Norge) i forbindelse med lusetelling. Samtlige fisk ble merket med individnummer, og det ble tatt blodprøver ved hjelp av BD Vacutainer nåler og samlet på grønne BD Vacutainer Sodium Heparin tubes. Heparin er en mye brukt antikoagulant for fisk, og det er viktig å vende røret etter prøvetakingen for å hindre koagulerings (Mainwaring & Rowley, 1985; Walencik & Witeska, 2007).

Av 10 individer (n=10) ble det skjært ut organer til histologi. Ved de tidligste uttakene ble hele organer tatt ut, mens ved økt fiskestørrelse ble vevsbiter på ca. 1 cm x 1 cm tatt ut og lagt på 4 % formalin. Forholdet mellom vev og formalin ble holdt til ca. 1:10. Av resterende 10 individer (n=10) ble det skjært ut organprøver til RNA-later med en tykkelse på maks 0,5 cm x 0,5 cm. Disse ble oppbevart i eppendorfrør. Organene som ble tatt ut til histologi og RNA var gjeller, thymus, hud, nesehule, hjerte, lever, pankreas, fettvev, milt, hodenyre og tarm. Nesehule ble bestemt ikke tatt ut til RNA-later.

2.3.1 Oppbevaring

På uttaksdagen ble blodprøvene sentrifugert på 1500 x g i 20 minutter på 4 °C (Heraeus. MultiFuge 1 S-R) så raskt som mulig etter prøveuttak. Sentrifugering fører til at blodet deler seg på grunn av ulikheter i massetetthet til de ulike komponentene, og man får en ansamling av røde blodceller i bunn og blodplasma i øverste lag (Lippi et al., 2007). Plasma ble overført til egne eppendorfrør merket med individnummer og dato. Det ble også laget plasma pools med de 10 første individene (n=10) på ca. 0,7 ml plasma fra hver. Prøvene ble lagret på -80 °C.

Histologiprøvene sto over natten, før man dagen etter skiftet formalin. Prøvene ble videre oppbevart på 4 °C. Prøvene på RNA-later ble oppbevart i 4 °C i ett døgn, før de ble flyttet over til -20 °C for videre lagring.

2.4 Analyser

2.4.1 Lengde og vekt

Lengde og vekt ble notert ned umiddelbart etter avlivning av totalt 20 fisk ved hvert uttak (n=20), med unntak av uttak uke -1 og 12. Lengde ble målt fra ytterste punkt på hodet til midten av halefinnen. Det ble brukt vekt fra anlegget med målebrett.

2.4.2 Speilberg-skala

Speilberg er mye brukt i norsk akvakultur som indikator på velferd. Den tar for seg graden av vaksinebivirkninger i individuelle fisk, der det blir gjort en visuell vurdering av patologiske endringer, der fisken blir scoret fra 0-6. Ved score 3 eller høyere er graden av bivirkninger etter vaksinen uønsket (Nilsson et al., 2017). I dette forsøket ble det gjennomført en modifisert Speilberg scoring basert på den opprinnelige skalaen (Midtlyng et al., 1996). Scoring ble gjort basert på bilder fra innside av samtlige fisk som ble tatt ut ved hvert prøveuttak (n=20). Det ble scoret fisk fra uke 22 etter vaksinerings frem til uke 74. Tidligere uttak er ikke tatt med da det ikke ble gjort scoring på uttaksdagen og heller ikke tatt bilder fra disse uttakene.

2.4.3 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) brukes til å detektere og kvantifisere antistoffer eller antigener i en gitt prøve (Gan & Patel, 2013). Metoden benytter seg av den spesifikke bindingen mellom et antistoff og et antigen. Det finnes ulike formater man kan gjennomføre tradisjonell ELISA med, og indirekte ELISA er en av disse. Et antigen i væskefase blir immobilisert vanligvis i en 96-brønners mikrotiterplate. Det blir tilsatt en blokkeringsbuffer som bidrar til å hindre uspesifikk binding til brønnene ved å blokkere alle områder i brønnene som ikke er belagt med antigen. Det blir tilsatt et spesifikt antistoff som binder seg til antigenet, som videre blir gjenkjent av et sekundært enzymkoblet antistoff. Ved å tilsette substrat får man en fargeendring som korresponderer med mengde primært antistoff i brønnen, som kan leses av i et spektrofotometer (Gan & Patel, 2013). Det ble brukt indirekte ELISA for begge bakterier i forsøket.

2.4.3.1 Dyrking av *Vibrio anguillarum* O2

Dyrking av bakterie skjedde under sterile forhold i avtrekksskap. Blodagar 2 % natriumklorid (NaCl) plate ble hentet fra kjøleskap (4 °C) og lagt i romtemperatur (RT) i 30 minutter før

oppstart. *V.anguillarum* O2 ble tatt opp fra fryser, og strøket ut på platen med en steril podenål. Platen ble inkubert ved 12 °C i to døgn i varmeskap (VWR, USA).

Videre ble det laget pre-kultur. Det ble tilsatt 5 ml MH medie i ønsket antall reagensrør. En koloni av bakterieutstryket ble overført per rør med en podenål. Reagensrørene ble satt på rister (IKA® VIBRAX VXR basic, Tyskland) ved hastighet 200 rpm over natten ved RT. Det ble laget «stor» kultur ved å ta 2 ml fra pre-kulturen overført til 160 ml MH medie. Den «store» kulturen ble satt på rister (IKA®KS 260 basic, Tyskland) ved hastighet 100 1/min over natten ved RT. Det ble målt OD-verdi (OD600nm) på «stor» kultur med spektrofotometer (BioMate3, Thermo Spectronic, USA) med ønsket verdi på rundt 1 (ca. 1×10^9 bakterie/ml). Ved for lav OD-verdi ble bakterien dyrket lenger. «Stor» kultur ble fiksert ved å tilsette 37 % formaldehyd (Sigma-Aldrich, Tyskland) til en endelig konsentrasjon på 0,05 % i bakteriekulturen (1620 µl). Deretter ble den satt på rører ved hastighet (50 1/min) i 30 minutter ved RT. Fiksert bakterie ble overført fra «stor» kultur til 50 ml rør, og sentrifugert på 875 G i 20 minutter. Deretter ble væsken fjernet med pipette. Det ble tilsatt 20 ml 0,9 % NaCl i alle rørene, og mikset godt sammen. Rørene ble sentrifugert på nytt på 1000 G i 10 minutter. Denne fortyningen og sentrifugeringen ble gjentatt en gang til.

Til slutt ble væsken fjernet og det ble tilsatt 10 ml 0,9 % NaCl i røret. Det ble målt OD-verdi ved OD600nm, med ønsket verdi rundt 0,5-0,6. Ved for høy OD-verdi ble det tilsatt mer NaCl, og ved for lav OD-verdi ble det tilsatt mindre. Deretter ble 20 ml overført til Falcon-rør, og lagt i -20 °C fryser til senere bruk.

2.4.3.2 Aeromonas salmonicida

Til ELISA med *A.salmonicida* ble det brukt tilsendte bakterier. Det ble mottatt to Falcon-rør med 50 ml inaktiverede *A.salmonicida* celler fra Vaccinova Bergen. De inneholdt titer ved 7×10^9 CFU/ml. CFU angir antall kolonidannende enheter per. ml løsning.

2.4.3.3 Finne fortyning av primært antistoff og plasma ved fortyningsserie

Det ble kjørt testplater med plasmapools fra uke 16 for å teste plasma og antistoff for resten av ELISA-målingene. Dette ble gjort for begge bakterier. Det ble brukt 96-brønners mikrotiterplater til alle kjøringene med ELISA (F96 Maxisorp Nunic-Immuno Plate, Thermo Fisher Scientific, Danmark).

Ved bruk av testplater ble det valgt ut egnet fortynning til både plasma og primærantistoff (mus anti-ørret IgM mAb (IgF1-18(6-1-18)) (Hedfers et al., 2012). Konsentrasjon av sekundærantistoff (HPR konjugert geit-anti mus IgG (Bio-Rad)) var allerede kjent fra tidligere arbeid. Videre ELISA-analyse med *V.anguillarum* ble kjørt med duplikater av fortynning 1:800 og 1:1600 av plasma. Primærantistoffet ble fortynnet 1:1600 og primærantistoffet ble fortynnet 1:8000. Positiv kontroll (PK) ble fortynnet fra 1:800. For *A.salmonicida* ble videre plasma kjørt i duplikater med fortynning 1:3200 og 1:6400. Primærantistoffet ble fortynnet 1:1000 og sekundærantistoffet ble fortynnet 1:8000. PK ble fortynnet fra 1:1000. Plater med pools ble kjørt i triplikater. Oversikt over plateoppsett er lagt ved i Vedlegg 3.

2.4.3.4 Utføring av ELISA

ELISA-plater med *A.salmonicida* ble forbehandlet med polylysin for å gi platen en positiv overflateladning slik at bakterien fester seg bedre til platen. Poly-L-lysin (0,1 %) løsning (Sigma Aldrich, USA) ble fortynnet 5 ug/ml i 0,05 M karbonatbuffer (pH 9,6) (Sigma Aldrich, Carbonate-Bicarbonate buffer capsule, USA). 100 µl PLL i buffer ble tilsatt i alle brønner og inkubert i fuktig boks over natten ved 4 °C. Platen ble vasket x3 med PBST (fosfatbufret saltvann med Tween 20) (fast vaskeprosedyre) og tilsatt 100 µl sonikert bakterie i 0,05 M karbonatbuffer (pH 9,6) (10 ml sonikert bakterie i 90 ml buffer). Platen ble sentrifugert på 875 x g i 10 minutter ved 4 °C. Sonikering av bakterie ble gjort i Sonoplus HD 60 sonikeringsmaskin (BANDELIN electronic GmbH & Co, Tyskland). Platen ble inkubert på 4 °C over natten i fuktig boks. For *V.anguillarum* ble 100 µl dyrket bakterieløsning tilsatt i alle brønner. Platen ble sentrifugert på 875 x g i 10 minutter ved 4 °C og inkubert på 4 °C over natten i fuktig boks.

Videre ble platene vasket før 200 µl blokkering ble tilsatt i alle brønnene. For *V.anguillarum* ble det brukt blokkeringsbuffer (Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer, Thermo Scientific, USA) og for *A.salmonicida* ble det brukt 5 % tørrmelk til blokkering av plater (Nonfat dried milk powder, PanReac AppliChem blandet med PBST). Platene ble inkubert i 2 timer i fuktig boks ved RT for *V.anguillarum* og over natten ved 4 °C for *A.salmonicida*. Platene ble vasket, og fortynnet plasma ble tilsatt med et totalt volum på 100 µl per brønn. For *V.anguillarum* ble det brukt blokkeringsbuffer til fortynning av plasma, mens for *A.salmonicida* ble det brukt 1% tørrmelk til fortynning av plasma. Det ble gjort en tofolds

fortynning for hvert individ/pool. PK samt blank (PBST/1% tørrmelk) ble tilsatt i hver plate. Platene ble inkubert i fuktig boks ved 4 °C over natten.

Etter vask ble platene tilsatt 100 µl primærantistoff og inkubert i fuktig boks i 1 time ved RT. Platene ble vasket og tilsatt 100 µl sekundærantistoff, og inkubert i fuktig boks i 1 time ved RT. Platene ble vasket og tilsatt 100 µl TMB (TMB Single Solution, Life Technologies, USA) i alle brønner og inkubert i mørk skuff i 10 minutter. Deretter ble 50 µl 2 M svovelsyre (H₂SO₄) tilsatt i alle brønner, og platene ble lest av umiddelbart i et spektrofotometer (VersaMax Absorbance Microplate Reader; Molecular Devices, LLC, USA) ved en bølgelengde på 405 nm.

2.4.3.5 Statistiske analyser og grafisk fremstilling

Gjennomsnittlig verdi av blank i hver plate ble trukket fra OD-verdiene på samme plate slik at man fikk fjernet bakgrunn. Alle pools ble kjørt på samme plate og normalisering var ikke nødvendig. For individer bør data bli normalisert for å kunne sammenligne ulike plater med hverandre. På grunn av variasjoner i PK for de ulike platene ved samme fortynning ble normalisering ble ikke gjennomført.

Det ble produsert grafer og kjørt statistiske analyser i GraphPad Prism 10. Det ble benyttet enveis-ANOVA (enveis variansanalyse) for å undersøke statistisk signifikans og *Tukey's multiple comparisons test* for sammenligning av forskjeller mellom ulike prøveuttak for pools. Forskjeller ble ansett som statistisk signifikante ved $p < 0,05$. For individer ble det kun fremstilt graf som viser de ulike individene og standardavvik.

2.4.4 Histologi

Histologi er læren om vev og cellene i vevene, og studeres vanligvis i tynne fargede snitt i mikroskop (Kryvi & Poppe, 2021). Evnen til å kunne forstå normal vevsstruktur og mikroanatomi er viktig for å kunne undersøke og tolke patologiske endringer som skyldes skade, infeksjon eller sykdom (Bruno et al., 2013a).

I dette forsøket ble histologiske undersøkelser gjennomført på grunnlag av å påvise vaksinegranulomer i forbindelse med fettvev, milt og pankreas. Det ble undersøkt fem fisk fra hvert prøveuttak (n=5), med unntak av uke 32 og 40 der det ble undersøkt tre fisk (n=3). Dette var på grunn av feil formalinfiksering fra disse ukene, og dermed dårlig kvalitet på vevsbiter.

Vevsprøvene ble fiksert på 4 % formalin (Formaldehyde solution 37 % (Sigma-Aldrich, USA) fortynnet i milli-Q vann (Fosfat-bufret saltvann, pH 7,3) etter hvert prøveuttak. Ved oppstart med histologi ble vevsprøvene skjært opp i mindre, egnede biter av ønsket vev. Vevsbitene ble lagt i plastkassetter, (Histosette, Tissue Processing/Embedding Cassettes, Simport® scientific, Canada) på 70 % etanol (VWR, USA). For hvert uttak ble fettvev, milt, pankreas og hodenyre fra fem fisk skjært ut, med en kassett per individ. Resterende organ ble ikke undersøkt videre.

2.4.4.1 Fremføring og innstøping av vevsprøver

Prøvene ble fremført ved hjelp av fremføringsmaskinen Shanon Citadel 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) med program A vist i Tabell 1. Etter endt program ble prøvene støpt inn i metallblokker med parafinvoks (Histowax®, Histolab Products AB, Sverige) ved hjelp av en Leica EG 1150H innstøpningsmaskin (Leica Biosystems, Tyskland). Tilhørende plastkassett uten lokk ble lagt over tilhørende metallblokk, og mer voks ble tilført. Prøvene ble lagret ved 4 °C, for å avkjøle seg til videre bearbeiding.

Tabell 1 Oversikt over Program A brukt for fremføring av vevsprøver med Shanon Citadel 2000.

Kar	Innhold	Tid
1	96 % etanol	2 t
2	96 % etanol	2 t
3	100 % etanol	2 t
4	100 % etanol	2 t
5	100 % etanol og HistoClear™ (1:1)	1 t
6	HistoClear™	1 t
7	HistoClear™	1 t
8	HistoClear™	1 t
9	HistoClear™ og parafinvoks (1:1)	1 t
10	Parafinvoks	3 t
Totalt		16 t

2.4.4.2 Snitting

Snitting ble gjennomført med en Leica RM2235 mikrotom (Leica, Biosystems GmbH, Tyskland). Blokkene ble nedkjølt på isbad før snitting for å forhindre smelting/bretting av parafinvoksen ved kutting. De ble snittet ned til ønsket dybde, deretter snittet med en tykkelse på 5 µm og overført til objektglass, Menzel-Gläser (Thermo Fisher Scientific, USA). Snittene ble deretter lagt til tørk før de ble satt i RT i lukket pose for videre bearbeiding.

2.4.4.3 Hematoksylin-eosin (HE-farging)

Dagen før farging ble objektglassene satt i varmeskap (Memmert GmbH, + Co.KG, Tyskland) på 64 °C over natten. Deretter ble snittene lagt i HistoClear™ i 4 minutter for å fjerne overflødig parafinvoks og overført til en Leica ST4020 Small Linear Stainer (Leica Biosystems, GmbH, Tyskland) for å fjerne siste voksrester, dehydrere, hydrere og farge etter standard fargemetode ved Norges Fiskerihøgskole vist i Tabell 2. Etter farging ble det manuelt montert på dekkglass (VWR, USA) på snittene ved bruk av Eukitt® (Sigma-Aldrich Co, USA). Snittene lå over natten i avtrekksskap, før de ble lagret ved RT for videre mikroskopering.

Tabell 2 Oversikt over HE farging (90 sekunder i hvert kar).

Kar	Innhold	Tid
1	Histoclear™	90 sek
2	100 % etanol	90 sek
3	96 % etanol	90 sek
4	96 % etanol	90 sek
5	Rennende vann	90 sek
6	Hematoxylin	90 sek
7	Hematoxylin	90 sek
8	Rennende vann	90 sek
9	Rennende vann	90 sek
10	Eosin	90 sek
11	96 % etanol	90 sek
12	96 % etanol	90 sek
13	100 % etanol	90 sek
14	100 % etanol	90 sek
15	Histoclear™	90 sek
Totalt		22 min 30 sek

2.4.5 Immunhistokjemi

Ved immunhistokjemi (IHC) kan man oppdage og lokalisere spesifikke antigener i celler og vev ved å benytte seg av den spesifikke bindingen mellom et antistoff og antigen. Substrat blir tilsatt for å synliggjøre antigen-antistoffbindingen, og det dannes sterk rød farge som undersøkes under mikroskop (Magaki et al., 2019).

I dette forsøket ble det brukt primærantistoff mot *A.samonicial*, *V.anguillarum* O1 og *V.anguillarum* O2. Dette er alle vaksinekomponenter som den fulgte fisken ble vaksinert med før utsett i sjø. IHC ble benyttet for å påvise tilstedeværelse og lokalisering av vaksineantigener. Organer til stede på snitt var fettvev, milt, pankreas og hodenyre. For

A.salmonicida ble det behandlet snitt fra alle prøveuttak etter vaksinerings (uke 12-73), med til sammen 28 individer (n=28). For *V.anguillarum* ble det behandlet snitt fra uke 12, 16 og 22 med til sammen 6 individer (n=6) for både *V.anguillarum* O1 og O2. Det ble benyttet negative kontroller for å utelukke uspesifikk binding. IHC ble utført ved Veterinærinstituttet Harstad, og deres metoder og reagenser er brukt.

2.4.5.1 Deparafinisering og rehydrering

For å gjøre snittene klar for videre behandling ble de plassert i Tissue-Tek Prisma Plus (Sakura, Japan) for å fjerne voksrester og hydrere vevssnittene. De ble først inkubert i 15 minutter på 60 °C for å feste snittene bedre og fjerne voks. Deretter ble snittene flyttet over til xylol for deparafinisering, etterfulgt av alkoholrekke og til slutt vann vist i Tabell 3.

Tabell 3 Deparafinisering, dehydrering og hydrering av vevssnitt.

Kar	Innhold	Tid
1	Ovn (60°C)	15 min
2	Xylol	30 sek
3	Xylol	4 min 30 sek
4	Xylol	5 min
5	100 % etanol	2 min 30 sek
6	100 % etanol	2 min 30 sek
7	95 % etanol	15 sek
8	70 % etanol	15 sek
9	Vann	2 min
Totalt		32 min 30 sek

2.4.5.2 Isolering av vevssnitt og trypsinbehandling

Deretter ble vevssnittene tegnet rundt med en Liquid Blocker Pen (Daido Sangyo, Japan). Snittene ble dekt med TBS (Tris-bufret saltvann) slik at de ikke skulle tørke mens tusjen tørket. Denne pennen danner en hydrofobisk barriere som bidrar til mindre bruk av reagenser og bedre kontroll på at hele snittet er dekket av reagenser. Videre ble snittene lagt i beholder (Coplins Staining Jar) med TBS. Deretter ble snittene satt til trypsinbehandling i 90 minutter med 0,05 % trypsin løsning i en inkubator ved 37 °C (Termaks, Bergen). Trypsin ble helt av og snittene ble vasket 2 x 5 minutter i beholder med TBS ved 4 °C.

2.4.5.3 Blokkering og immunohistokjemisk farging

TBS ble helt av og snittene ble lagt i fuktammer. Det ble tilsatt to dråper blokkeringsbuffer Normal Horse Serum 2,5 % (Vector Laboratories, USA) og inkubert i 20 minutter i RT.

Bufferen ble helt av og snittene tilsatt 100 µl primærantistoff (fortynnet i BSA – Bovint serumalbumin), 1:100 mus anti-*A.salmonicida* og 1:500 kanin anti-*V.anguillarum*. Glassene med *A.salmonicida* ble inkubert i RT over natten, mens glassene med *V.anguillarum* ble inkubert i 30 minutter i RT.

Snittene ble helt av og lagt i beholder med TBS i 5 minutter. Vevssnittene ble overført til fukt-kammer og sekundærserum Horse Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories, USA) ble tilsatt, og inkubert i 30 minutter i RT. Snittene ble helt av og lagt i beholder med TBS i 5 minutter i RT. Deretter ble det tilsatt substrat Red Substrate KIT, Alkaline Phosphatase (Vector Laboratories, USA) slik at hele biopsien var dekket i 10 minutter. Snittene ble lagt under rennende vann i 5-10 minutter, deretter lagt i Tissue-Tek Prisma Plus for kontrastfarging vist i Tabell 4. Til slutt ble en tynn film limt over objektglasset (Tissue-Tek Film, Sakura Japan).

Tabell 4 Oversikt over kontrastfarging av vevssnitt.

Kar	Innhold	Tid
1	Hematoksylin	1 min
2	Vann	1 min 30 sek
3	Blåning	1 min
4	Vann	30 sek
5	Vann	30 sek
6	70% etanol	15 sek
7	95% etanol	15 sek
8	100% etanol	10 sek
9	100% etanol	10 sek
10	100% etanol	15 sek
11	Xylol	10 sek
12	Xylol	
Totalt		5 min 45 sek

2.4.6 Real-Time PCR

Ved bruk av polymerasekjedereaksjon (PCR) kan man amplifisere små mengder DNA. Real-Time PCR skiller seg fra vanlig PCR ved at den måler mengden produkt ved hver syklus, og kan brukes til å kvantifisere DNA eller RNA i en prøve. Mengde DNA blir målt ved bruk av fluorescerende fargestoffer som fester seg til dobbeltrådig DNA og gir økende signal proporsjonalt med antallet PCR-produktmolekyler som blir amplifisert etter hver syklus. Det vil i de første syklusene være små endringer i fluorescens. Dette blir kalt bakgrunn, og det blir

satt en «baseline» for å eliminere denne. Når det skjer en signifikant økning i fluorescens, vil man kunne sette en terskelverdi som markerer en signifikant økning over bakgrunnsstøyen. Amplifiseringssyklusen som fører til at fluorescens signalet overstiger terskelverdien kalles Ct (*cycle threshold*). Denne verdien er omvendt relatert til startmengden av produktet, dermed vil en høy Ct verdi tilsi mindre cDNA (komplementært DNA) i prøven og mindre uttrykk av genet. En lav Ct verdi vil tilsi få amplifiseringskurver før genuttrykket oversteg terskelverdien, og mengden cDNA i prøven er dermed høy (Technologies, 2014).

Hver amplifiseringsyklus i Real-Time PCR består av tre steg: denaturering, hybridisering og ekstensjon. Denaturering skjer ved høy temperatur for å få dobbeltrådig DNA (dsDNA) til å «smelte» til enkeltrådig DNA (ssDNA). Hybridisering skjer ved lavere temperatur slik at de spesifikke primerene kan binde seg til ønsket gen. Ved ekstensjon blir temperaturen satt optimalt for DNA polymerase som starter syntese av ny DNA-tråd (Technologies, 2014).

For å kunne gjennomføre PCR må RNA først bli isolert. I dette forsøket ble det brukt RNeasy Mini kit (Qiagen, Tyskland). Videre må isolert RNA gjennomgå cDNA syntese, og det ble brukt QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Tyskland). Her blir genomisk DNA (gDNA) fjernet ved bruk av gDNA wipeout buffer, slik at man får et så rent RNA som mulig. Deretter blir RNA reverstranskribert til cDNA ved bruk av primere, buffer og enzymet revers transkriptase (Qiagen, 2009, 2023).

I denne oppgaven ble Real-Time PCR brukt til detektering av mIgM og sIgM i syntetisert cDNA fra pankreas og hodenyre for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble brukt fem individer fra hver uke (n=5). Det ble benyttet Fast SYBR® Green Master mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) og primere for gen som skal undersøkes. Som referansegene ble EF1 α benyttet. I Tabell 5 er det oversikt over benyttede gen og primersekvenser i forsøket (Strandskog et al., 2011). Primereffektivitet er tatt utgangspunkt i resultat fra tidligere forsøk (Nordstrand, 2021).

Tabell 5 Oversikt over gen og primersekvenser brukt i forsøket (Strandskog et al., 2011). Primereffektivitet fra tidligere forsøkt er tatt med (Nordstrand, 2021).

Gen	Primer sekvens	Effektivitet
mIgM	Fw: CCTACAAGAGGGGAGACCGA Rv: GATGAAGGTGAAGGCTGTTTT	1,986
sIgM	Fw: CTACAAGAGGGGAGACCGGAG Rv: AGGGTCACCGTATTATCACTAGTTT	2,005
EF1 α	Fw: TGCCCCTCCAGGATGTCTAC Rv: CACGGCCACAGGTACTG	2,034

2.4.6.1 Isolering av RNA

Ved isolering av RNA ble det brukt RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tyskland). Prøver på RNA-later ble tatt opp fra -20°C fryser og lagt på is. Prøvematerialet ble kuttet i biter på maks 30 μg , og overført til eppendorfrør som inneholdt 750 μl RLT buffer (35 mL RLT buffer og 700 μl DTT (Thermo Fisher Scientific, USA)) og metallkule. Prøvene ble satt i Tissue Lyser 2 (Quiagen, Hilden, Tyskland) for homogenisering i 1-2 minutter på 20 1/s avhengig av type vev. Deretter ble prøvene sentrifugert i Eppendorf centrifuge, 5417R (Eppendorf®, Hamburg, Tyskland) i 3 minutter på maksimal hastighet. 700 μl lysat ble pipettert ut og tilsatt nytt eppendorfrør med 700 μl 70 % etanol.

Dette ble mikset godt sammen, og deretter ble det overført 700 μl lysat til RNeasy spinnkolonne, og sentrifugert i 15 sekunder på 8000 x g. Oppsamlingsrør med avfall ble fjernet og det ble satt på nytt oppsamlingsrør mellom hver sentrifugering. Dette ble gjort i de to påfølgende vaskestegene, den første med tilsatt 700 μl RW1 buffer og den andre tilsatt 500 μl RPE buffer. I siste vaskesteg ble det tilsatt 500 μl RPE buffer i kolonnen, og sentrifugert på 8000 x g i 2 minutter. Videre ble det igjen tilsatt nytt oppsamlingsrør, og prøvene ble tørket ut ved å sentrifugere dem på 8000 x g i 1 minutt. Det ble tilsatt 40 μl RNase-free water (QIAGEN GmbH, Hilden, Tyskland), og sentrifugert i 1 minutt på 8000 x g. Ekstrahert RNA ble overført til nye RNA-rør og lagt rett på is (Qiagen, 2021).

Kvaliteten og konsentrasjon på isolert RNA ble testet ved å lese av verdier gjennom programvaren NanoDrop 3.1.2 ved bruk av ND-1000 spectrophometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). For å sjekke om prøven var kontaminert med protein ble forholdet mellom absorpsjonen 260 nm og 280 nm sjekket. Her bør forholdstallet være mellom 1,7 og 2. For å sjekke hvor rent RNAet er ser man på forholdet mellom absorpsjonen 230 nm til 260

nm. Dette tallet bør være over 1,6-1,7. Videre ble prøvene fryst ned på -80 °C, siden cDNA syntese ikke skulle kjøres samme dag.

2.4.6.2 cDNA-syntese

Ved cDNA-syntese ble det brukt QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Tyskland). Konsentrasjonen av samtlige RNA-prøver ble målt ved hjelp av Nanodrop, og ved bruk av denne ble det regnet ut hvilken fortyning som skal brukes. Alle prøvene skal ha lik konsentrasjon på 500 ng/µl i 10 µl vann (Hypure Molecular Biology Grade Water, USA). Det ble brukt PCR strips fra Thermo Scientific (0,2 ml Thin-walled 8 tube & Domed Cap strips). Først ble 10 µl vann tilsatt i alle strips. Deretter ble gDNA vortksetset (Heidolph Reax 2000 Vortex Mixer) og tilsatt 2 µl i alle prøvene, før stripsene ble spunnet ned. Deretter ble RNA tilsatt i utregnet mengde for å få ønsket konsentrasjon. Alle prøvene ble de vortekset og spunnet ned. RT enzym ble brukt som kontroll. Prøvene ble inkubert i 2 minutter på 42 °C i VeritiPro™ Thermo Cycler, 96-well (Applied biosystems, USA). Det ble laget en mastermiksvist i Tabell 6 og tilsatt 6 µl i hver prøve med RNA. Prøvene ble vortekset og spunnet ned, deretter inkubert på 42 °C i 15 minutter og 95 °C i 3 minutter i VeritiPro™ Thermal Cycler, 96-well. Prøvene ble deretter fryst ned på -20 °C.

Tabell 6 Oversikt over reagenser brukt i mastermiksvist per prøve ved cDNA syntese.

Reagenser	cDNA syntese
QS RT	1 µl
QS RT buffer	4 µl
RT primer mix	1 µl
Totalt	6 µl
RNA	14 µl
Totalt	20 µl

2.4.6.3 Real-Time PCR

cDNA ble satt på is og tint, vortekset og spunnet ned. Det ble laget en primermiksvist med forward og reverse primer, 15 µl av hver blandet med 270 µl vann. Deretter ble det laget en mastermiksvist med innhold presentert i Tabell 7. Mastermiksvisten ble blandet, spunnet ned og fordelt ved bruk av multikanalpipette i MicroAmP® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied biosystems, USA). Videre ble 5 µl cDNA (1:5) tilført i duplikater i hver brønn med mastermiksvist, før platen ble foliert i plast og spunnet ned.

Tabell 7 Oversikt over reagenser brukt i mastermix per prøve og mengde cDNA i Real-Time PCR.

Reagenser	EF α 1	mIgM	sIgM
Fast SYBR® Green	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Primer Fw og Rv	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Vann	4 μ l	4 μ l	4 μ l
Totalt volum av mastermix	15 μ l	15 μ l	15 μ l
cDNA	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Totalt reaksjonsvolum	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Videre ble platen undersøkt med programvaren 7500 Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific, USA) i en 7500 Fast Real-Time PRC system (Thermo Fisher Scientific, USA). Det ble kjørt smeltekurveanalyse for samtlige brønner. Benyttet program er presentert i Tabell 8.

Tabell 8 Oversikt over reaksjonsstegene i Real-Time PCR med SYBR® Green.

Reaksjonssteg	Temperatur (°C)	Varighet	Antall sykluser
Denaturering	95	20 sek	Hold-fase
Denaturering	95	3 sek	40
Hybridisering og ekstensjon	60	30 sek	40
Smeltekurve	95	15 sek	Kontinuerlig
	60	60 sek	
	95	15 sek	
	60	15 sek	
Totalt		2 min 38 sek	

2.4.6.4 Håndtering av rådata og grafisk fremstilling

Det ble brukt Excel til organisering og kalkulering av data fra Real-Time PCR. Videre ble det produsert grafer og kjørt statistiske analyser i GraphPad Prism 10. Grafer ble presentert som relativt uttrykk (R) av mIgM og sIgM ved bruk av Formel 1 som er en variant av Livak metoden (Livak & Schmittgen, 2001). Formelen tar utgangspunkt i at primereffektiviteten er tilnærmet lik 2 som tilsier 100% effektivitet og en dobling av templatet mellom hver amplifikasjon. Gjennomsnittlige Ct verdier og standardavvik for EF1 α , mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas er lagt ved i Vedlegg 4.

$$R = \text{Ratio}_{\text{referansen}/\text{målgen}} = 2^{\text{Ct}_{\text{referansen}} - \text{Ct}_{\text{målgen}}} = 2^{-\Delta\text{Ct}} \text{ (Formel 1)}$$

I Vedlegg 5 er det lagt ved grafer som presenter genuttrykk som fold endring (Formel 2) basert på Livak metoden (Livak & Schmittgen, 2001). Grafen er presenter på log₂-skala. $\Delta\Delta\text{Ct}$ tilsvarer forskjell mellom målgen og referansen på to ulike tidspunkt ($\text{Ct}_{\text{målgen}} -$

$C_{\text{referansegen}}^{\text{tid } x} - (C_{\text{målgen}} - C_{\text{referansegen}})^{\text{tid } 0}$. I dette forsøket ble uke 12 satt som tid 0. Utregningene er basert på samme antagelser som i Formel 1.

$$\text{Fold endring} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (\text{Formel 2})$$

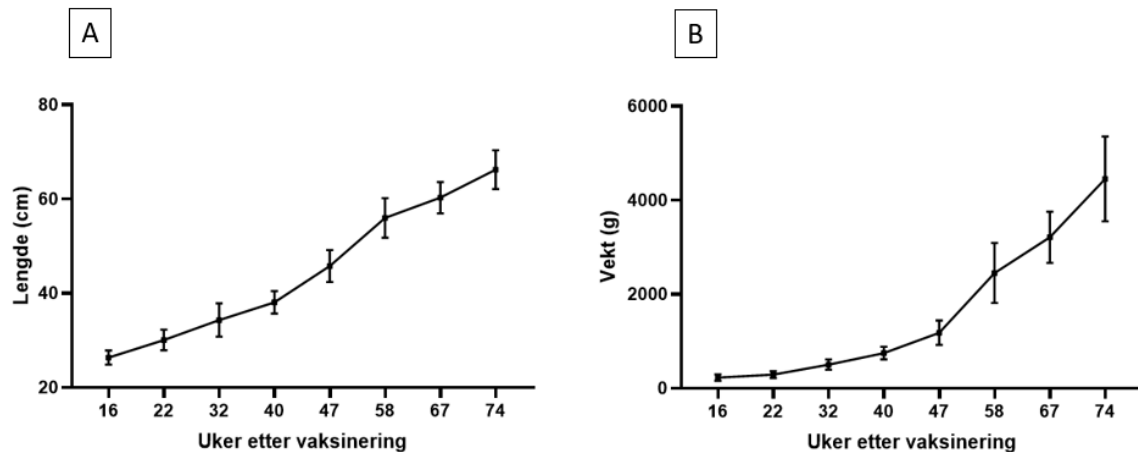
Data ble sjekket for normalfordeling ved bruk av Shapiro-Wilk og D'Agostino-Pearson omnibus test. Data ble log transformert for å oppnå normalfordelte data. Det ble benyttet enveis-ANOVA for å undersøke statistisk signifikans og sammenligning av forskjeller mellom ulike prøveuttak ble testet med *Tukey's multiple comparisons test*. Forskjeller ble ansett som statistisk signifikante ved $p < 0,05$.

3 Resultater

3.1 Velferd

3.1.1 Lengde og vekt

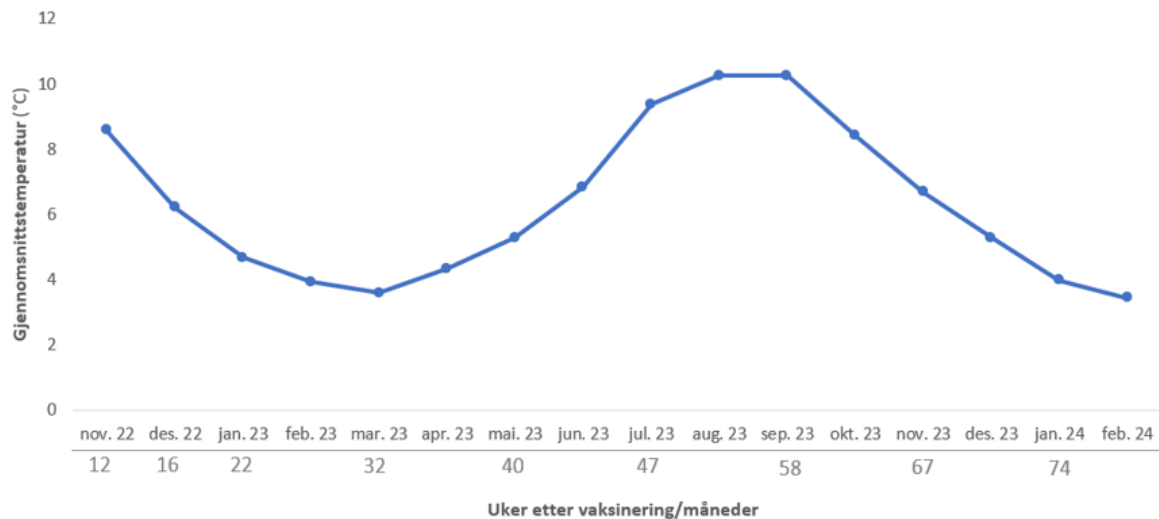
Figur 2 viser gjennomsnittslengde (cm) og vekt (g) for den fulgte fiskegruppen fra uke 16-74 etter vaksinerings. Det ble tatt ut likt antall individer ved hvert prøveuttak ($n=20$).



Figur 2 Gjennomsnittlig lengde (cm) og vekt (g) for den fulgte fiskegruppen fra uke 16-74 etter vaksinerings. Ved hvert prøveuttak er det tatt gjennomsnittet av 20 undersøkte individer ($n=20$). Standardavvik er regnet ut, og presentert for hver prøveuke.

Resultatet viser at fiskengruppen hadde en økning i både lengde og vekt gjennom hele perioden. Ved uke 16 var gjennomsnittslengde og vekt på henholdsvis 26,35 centimeter og 228,25 gram. Ved siste prøveuttak var de på 66,25 centimeter og 4455,50 gram. Både lengde og vekt steg mest mellom uke 47 og 58. Vekten har også en nesten tilnærmet lik økning mellom uke 67 og 74. Standardavviket for lengde økte de tre første uttakene, før den gikk noe ned i uke 40, og deretter opp igjen. Det høyeste standardavviket var i uke 58 der det største individet var 62,50 cm og det minste individet var 45,00 cm ($SD=4,105$). Standardavviket for vekt økte gjennom hele perioden fisken ble fulgt i sjø, med unntak av uttak i uke 67. Det høyeste standardavviket var i uke 74 der det største individet var 6500,00 gram og minste individet var 3120,00 gram ($SD=878,820$).

Figur 3 viser gjennomsnittstemperatur på lokaliteten gjennom sjøfasen til den fulgte fiskegruppen. På x-aksen er måned og år, samt prøveuttaksuke i forhold til vaksineringsuke. På y-aksen er gjennomsnittstemperatur (°C).

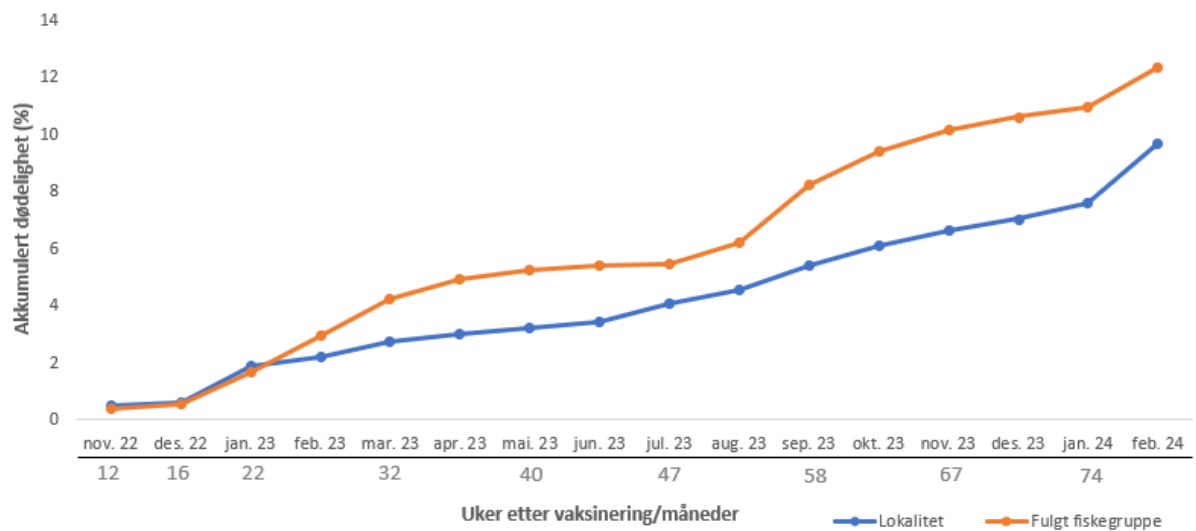


Figur 3 Oversikt over gjennomsnittstemperatur gjennom sjøfasen til den fulgte fiskegruppen fra første prøveuttak i uke 12 etter vaksineringsuke til uke 74 etter vaksineringsuke. På x-aksen er måned og år, samt prøveuttaksuke i forhold til vaksineringsuke. På y-aksen er gjennomsnittstemperatur (°C).

Gjennomsnittstemperaturen gjennom den fulgte perioden i sjø viser sesongvariasjoner. Høyeste gjennomsnittstemperatur var i september 2023 på 10,25 °C. November 2022 – februar 2023 hadde en høyere gjennomsnittstemperatur (5,84 °C) enn november 2023 – februar 2024 (4,84 °C), tilsvarende en høyere temperatur på 1 °C (data hentet fra Barentswatch).

3.1.2 Dødelighet

Figur 4 viser akkumulert dødelighet for den fulgte fiskegruppen og for lokaliteten hver måned etter utsett av den fulgte fiskegruppen. Uker etter vaksinerings er vist ved den tilhørende måneden. Dødelighet er registrert av de ansatte på lokaliteten, og tallene er hentet fra tilhørende besøksrapporter (NRS, 2023; Åkerblå, 2023-2024).

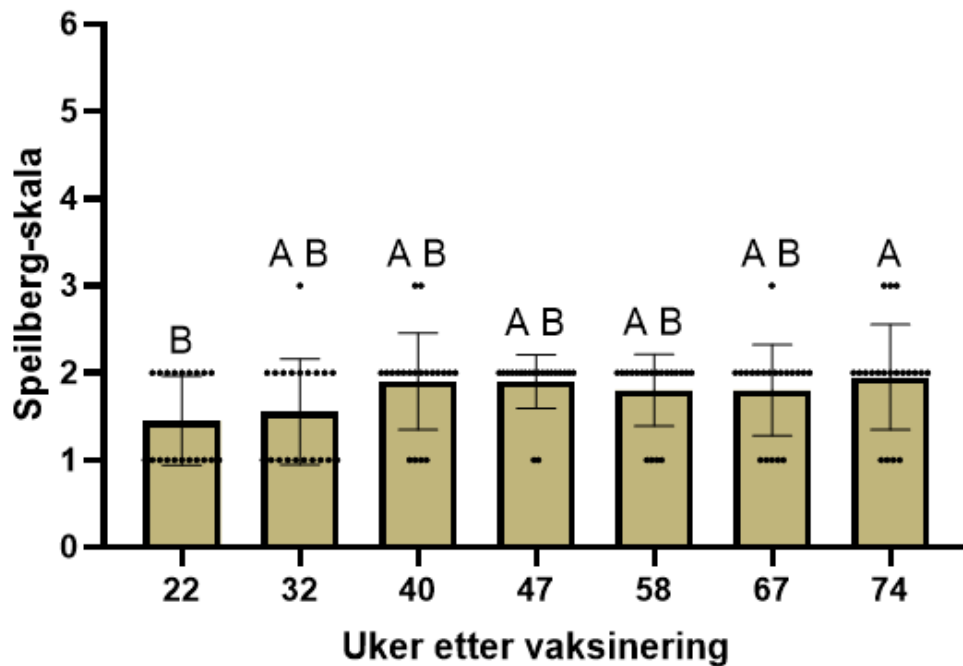


Figur 4 Akkumulert dødelighet for den fulgte fiskegruppen og for lokaliteten. Figuren viser registrert dødelighet for hver måned siden utsett av den fulgte fiskegruppen og lokaliteten. Dødeligheten er kontrollert og registrert av de ansatte på anlegget. Tallene er hentet fra tilhørende besøksrapporter.

Resultatene viser akkumulert dødelighet som ender på 9,65 % for lokaliteten og 12,3 % for fulgt fiskegruppe. Allerede fra uttak 22 og videre utover har den fulgte fisken større akkumulert dødelighet enn lokaliteten. For fulgt fiskegruppe er det to svingninger på grafen. Første topp starter i januar 2023 og neste topp starter i august 2023. For lokaliteten er det ikke like tydelige svingninger, men det skjer en tydelig økning mellom januar og februar 2024.

3.1.3 Speilberg-skala

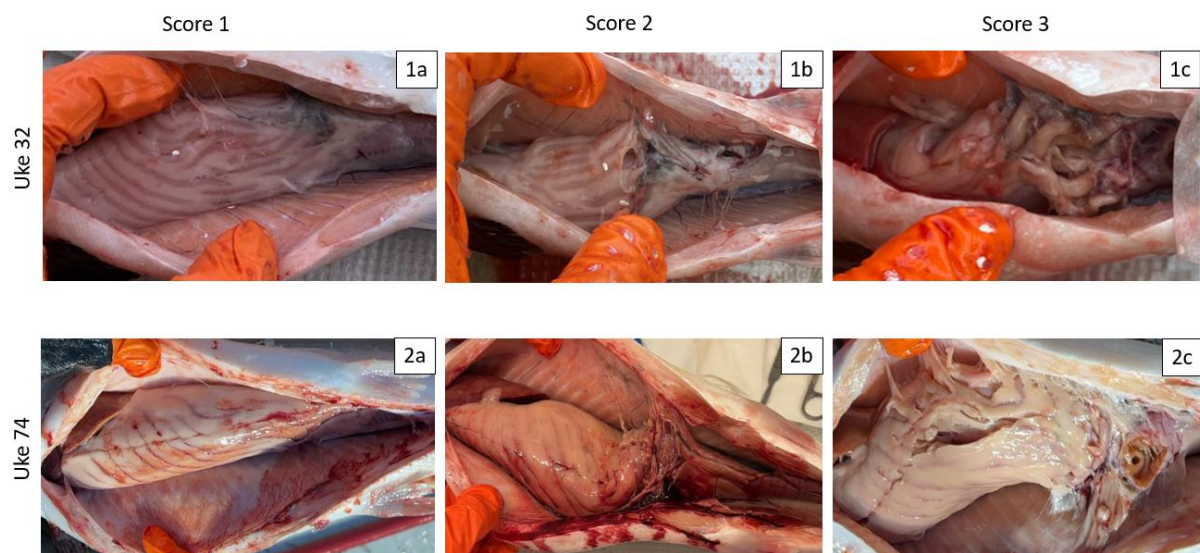
Figur 5 viser gjennomsnittlig Speilberg-score ved prøveuttak uke 22-74 etter vaksinerings (n=20). Det ble gjennomført en modifisert Speilberg-score basert på den opprinnelige skalaen utarbeidet av (Midtlyng et al., 1996). Scoring ble gjort i etterkant ved hjelp av bilder fra innside av samtlige fisk som var tatt ut ved hvert prøveuttak. Data ble analysert statistisk og forskjeller mellom ukene regnes som signifikant ved $p < 0,05$.



Figur 5 Speilberg score av den fulgte fiskegruppen fra uke 22-74 etter vaksinerings. Det ble gjennomført en modifisert scoring basert på skala utarbeidet av (Midtlyng et al., 1996), der fisken ble rangert i etterkant av prøveuttak ved hjelp av bilder. Det ble scoret likt antall individer (n=20) for hvert prøveuttak. Statistiske forskjeller er vist ved A og B, der ulike bokstaver angir signifikant forskjell mellom ukene og $p < 0,05$.

Resultatene viser at samtlige undersøkte fisk fra uke 22 til 74 etter vaksinerings hadde vaksineinduserte sammenvoksinger. En gjennomsnittlig Speilberg-score på 1,45 ved uke 22. Deretter får man en stigning frem til uke 40 og 47 med en gjennomsnittlig score på 1,9. I uke 58 og 67 er gjennomsnittlig score 1,8, og i uke 74 er den 1,85. Standardavviket var størst i uke 32 på 0,59 og minst i uke 47 på 0,30. Statistiske analyser viser en signifikant forskjell mellom uke 22 og 74 ($p < 0,0384$). Alle undersøkte fisk fikk en score mellom 1-3. Alle uker hadde fisk med score 1 og 2, mens uke 32, 40, 67 og 74 hadde fisk med score 3.

Figur 6 viser illustrasjon av hvordan fisken så ut ved de ulike Speilberg-scoringene (1-3) som er gitt i dette forsøket. Dette for å gi en indikasjon på vurderingene som er tatt. Bildene viser fisk henholdsvis fra uke 32 og 74 etter vaksinerings, med økende score.

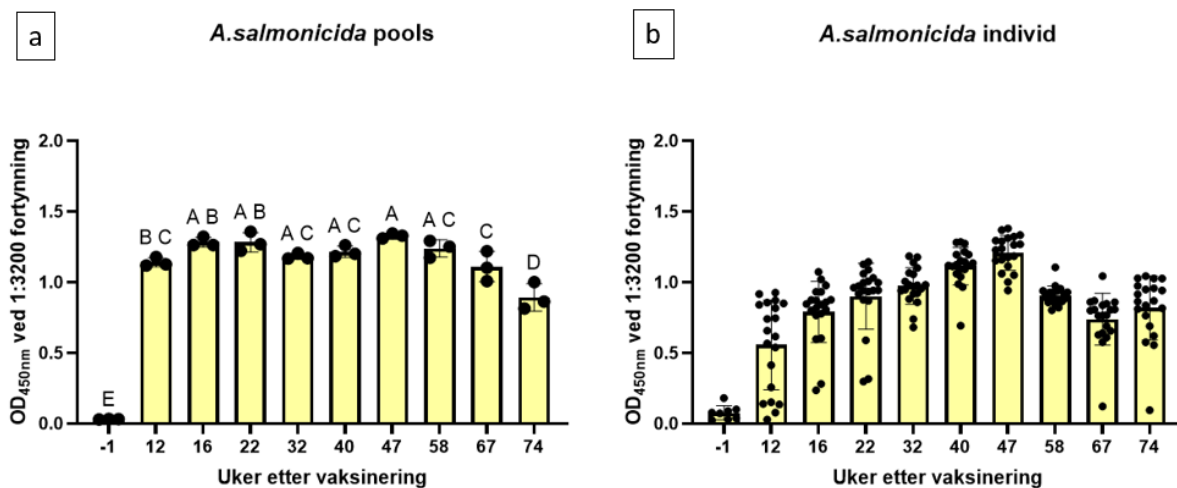


Figur 6 Illustrasjon av Speilberg-score 1-3 fra uke 32 og 74 etter vaksinerings. 1a og 2a viser fisk gitt score 1 fra henholdsvis uke 32 og 74. 1b og 2b viser fisk gitt score 2, og 1c og 2c viser fisk gitt score 3.

Ved fisk gitt score 1 er det observert små sammenvoksinger ofte lokalisert nær injeksjonsstedet. Bivirkningene er såpass små at de mest sannsynlig ikke vil bli lagt merke til av ufaglært ved sløyting. Ved score 2 er det observert mindre sammenvoksinger som ofte omfatter tykktarm, milt eller blindsekker koblet til bukveggen. Ved score 3 er det observert mer moderate sammenvoksinger inkludert fremre deler av bukhulen (Midtlyng et al., 1996). Første score 3 ble gitt i uke 32, og det ble også funnet fisk med score 3 i uke 40, 67 og 74. Ut fra resultatene er det ikke endring i type score gitt fra uke 32 og 74, noe som indikerer at vaksinebivirkningene er like omfattende etter 15 måneder i sjø.

3.2 ELISA

Figur 7 viser OD-verdier for *A.salmonicida* pools (a) og individer (b). Verdiene som er presentert er gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner for pools og duplikate brønner for individer med en fortykning på 1:3200 av plasma. Antall fisk for pools (n=10) og individer (n=20), unntatt pool og individ -1 (n=9). Samtlige prøveuttak er presentert, fra uke -1 før vaksinerings til uke 74 etter vaksinerings. Data for pools (a) ble analysert statistisk og forskjeller mellom ukene regnes som signifikant ved $p < 0,05$.

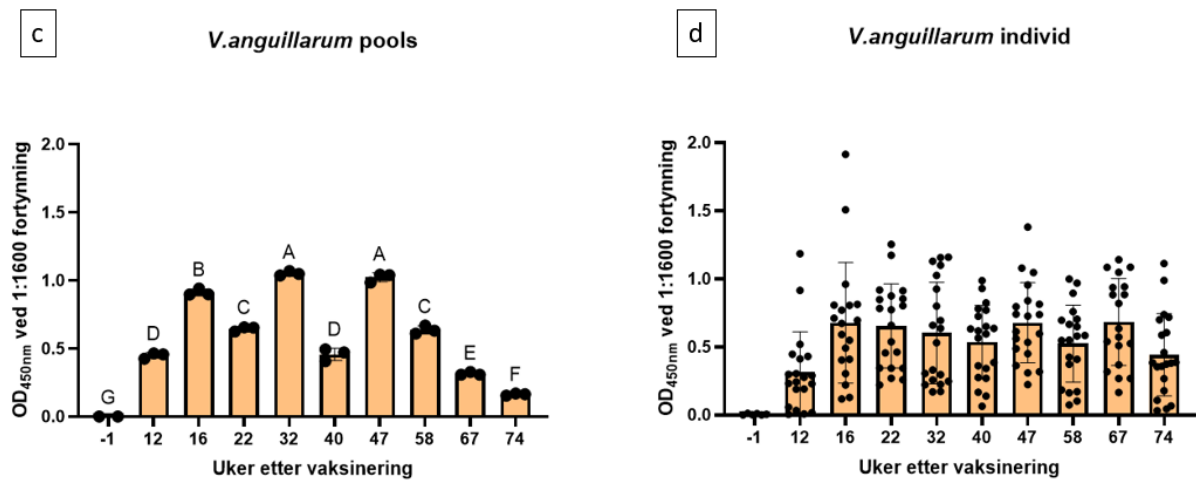


Figur 7 OD-verdier for *A.salmonicida* pools (a) og individer (b). Antall fisk (n) for pools (n=10) og for individer (n=20), unntatt for uke -1 før vaksinerings (n=9). Samtlige prøveuttak er presentert, fra uke -1 før vaksinerings til uke 74 etter vaksinerings. Statistiske forskjeller er vist ved A og B, der ulike bokstaver angir signifikant forskjell mellom ukene og $p < 0,05$.

Resultatene viser en økning i alle uttak sammenlignet med uvaksinert fisk (uke -1) for både pools (a) og individer (b). Høyeste gjennomsnittlig OD-verdi for pools (a) og individ (b) var i uke 47 på henholdsvis 1,329 og 1,208. Statistiske analyser viser en signifikant forskjell på alle uttak sammenlignet med uke -1 for pools (a). Det er noe spredning i individene (b) ved samme prøvetidspunkt, og i uke 12 er det størst spredning. Her er laveste OD-verdi målt til 0,030 og høyeste verdi målt til 0,927. Resterende uker har også individer som skiller seg ut, men har en mer tydelig ansamling.

Figur 8 viser OD-verdier for *V.anguillarum* pools (c) og individer (d). Verdiene som er presentert er gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner for pools og duplikate brønner for individer med en fortykning på 1:1600 av plasma. Antall fisk for pools (n=10) og individer (n=20), unntatt pool og individ -1 (n=9). Samtlige prøveuttak er presentert, fra uke -1 før

vaksinering til uke 74 etter vaksinering. Data for pools (c) ble analysert statistisk og forskjeller mellom ukene regnes som signifikant ved $p < 0,05$.



Figur 8 OD-verdier for *V.anguillarum* pools (c) og individer (d). Antall fisk (n) for pools (n=10) og for individer (n=20), unntatt for uke -1 før vaksinering (n=9). Samtlige prøveuttak er presentert, fra uke -1 før vaksinering til uke 74 etter vaksinering. Statistiske forskjeller er vist ved A og B, der ulike bokstaver angir signifikant forskjell mellom ukene og $p < 0,05$.

Resultatet viser en økning i alle uttak sammenlignet med uke -1 for både pools (c) og individer (d). Høyeste gjennomsnittlige OD-verdi er målt for uke 32 på 1,051 for pools (c). For individer var høyeste gjennomsnittlig OD-verdi i uke 67 på 0,684. Statistiske analyser (c) viser signifikante forskjeller på alle uttak sammenlignet med uke -1. Det er også variasjoner mellom ukene etter vaksinering, og det er signifikante forskjeller på alle bortsett fra uke 12 og 40, uke 22 og 58 og uke 32 og 47 (c). Individene (d) viser spredning for alle ukene, der uke 16 har størst spredning med høyeste OD-verdi på 1,915 og laveste 0,118.

3.3 Histologi

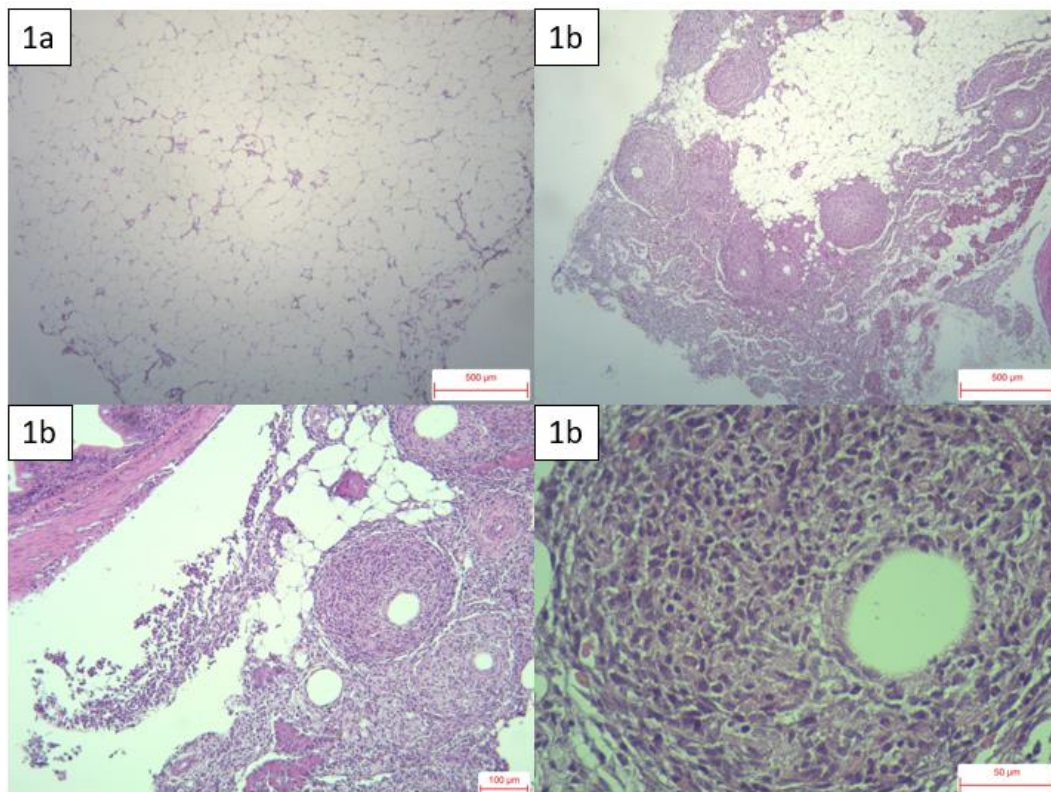
3.3.1 Vaksinegranulomer

Tabell 9 viser funn av vaksinegranulomer etter vaksinerings ved hjelp av histologiske undersøkelser av HE-fargede snitt med fettvev, milt og pankreas. Det ble undersøkt 5 fisk fra hvert prøveuttak (n=5), med unntak av uke 32 og 40 der det ble undersøkt 3 fisk (n=3). Totalt 41 fisk ble undersøkt.

Tabell 9 Funn av vaksinegranulomer i HE-fargede snitt med fettvev, milt og pankreas i uker etter vaksinerings. Antall fisk for hver uke (n=5) ved alle uttak, men unntak av uke 32 og 40 (n=3).

Uker etter vaksinerings	12	16	22	32	40	47	58	67	74
Vaksinegranulom (fettvev, milt, pankreas)	2/5	5/5	2/5	0/3	0/3	0/5	0/5	0/5	0/5

Figur 9 viser bilder tatt med mikroskop av fettvev med (1a) og uten (1b) vaksinegranulom. Bilde uten granulomer (1a) er tatt med forstørrelse 4x med en målestokk på 500 μm . Bilder med vaksinegranulomer (1b) er tatt med forstørrelse 4x, 10x og 40x med en målestokk på henholdsvis 500 μm , 100 μm og 50 μm . Snittene er kuttet med en tykkelse på 5 μm .



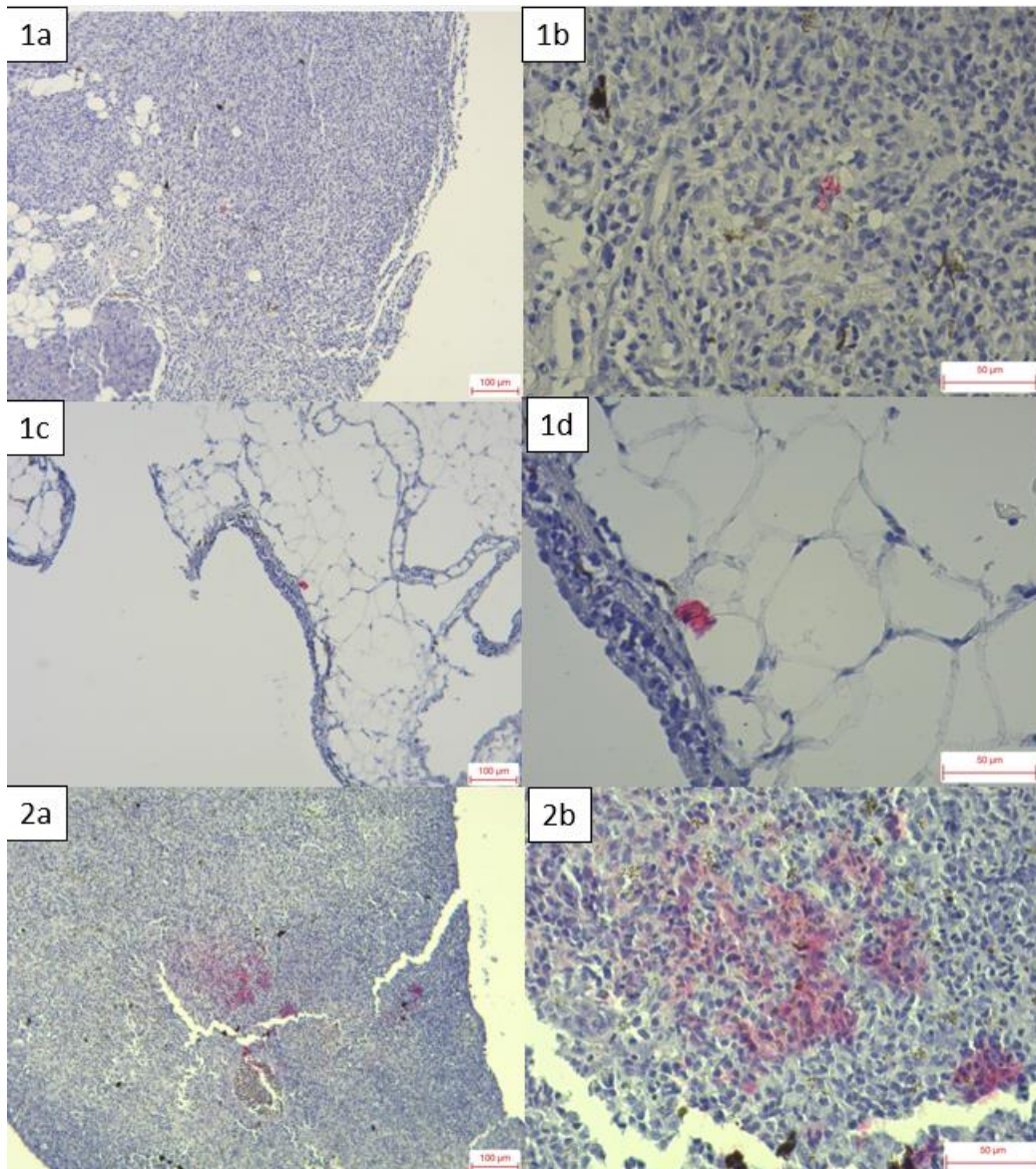
Figur 9 HE-farget fettvev uten (1a) og med (1b) vaksinegranulomer. Fettvev (1a) uten vaksinegranulom er vist med målestokk 500 μm med 4x forstørrelse. Fettvev med vaksinegranulom (1b) er vist med målestokk 500 μm , 100 μm og 50 μm med forstørrelse 4x, 10x og 40x. Tykkelse på snitt er 5 μm .

Resultatene viser at det ble funnet vaksinegranulomer i de tidlige uttakene etter vaksinerings (uke 12, 16 og 22), men ikke ved senere tidspunkt. Det ble funnet totalt 9 individer med vaksinegranulomer av totalt 41 undersøkte individ. Størst forekomst var i uke 16, der alle undersøkte individer hadde granulomer (n=5). Det er store forskjeller på fettvev med (1a) og uten (1b) vaksinegranulomer. Uten vaksinegranulomer (1a) ser man store tydelige fettceller, mens med granulomer (1b) kan man se at fettcellene er erstattet med celler som inngår i betennelsesreaksjoner.

3.3.2 Immunhistokjemi

Figur 10 viser snitt behandlet med IHC med primærantistoff mot *A.salmonicida* (n=28).

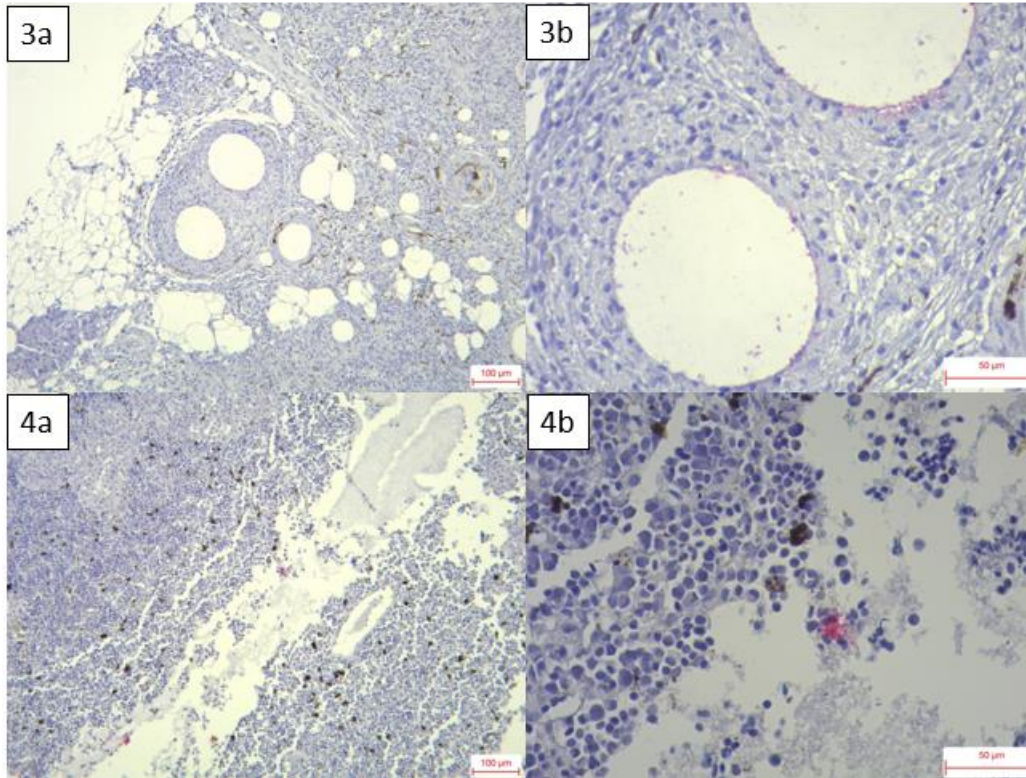
Tilstedeværelse av vaksinekomponent gir en klar rødfarge. Bildene er tatt i forstørrelse 10x og 40x med en målestokk på 100 μm og 50 μm . Snittene har en tykkelse på 5 μm .



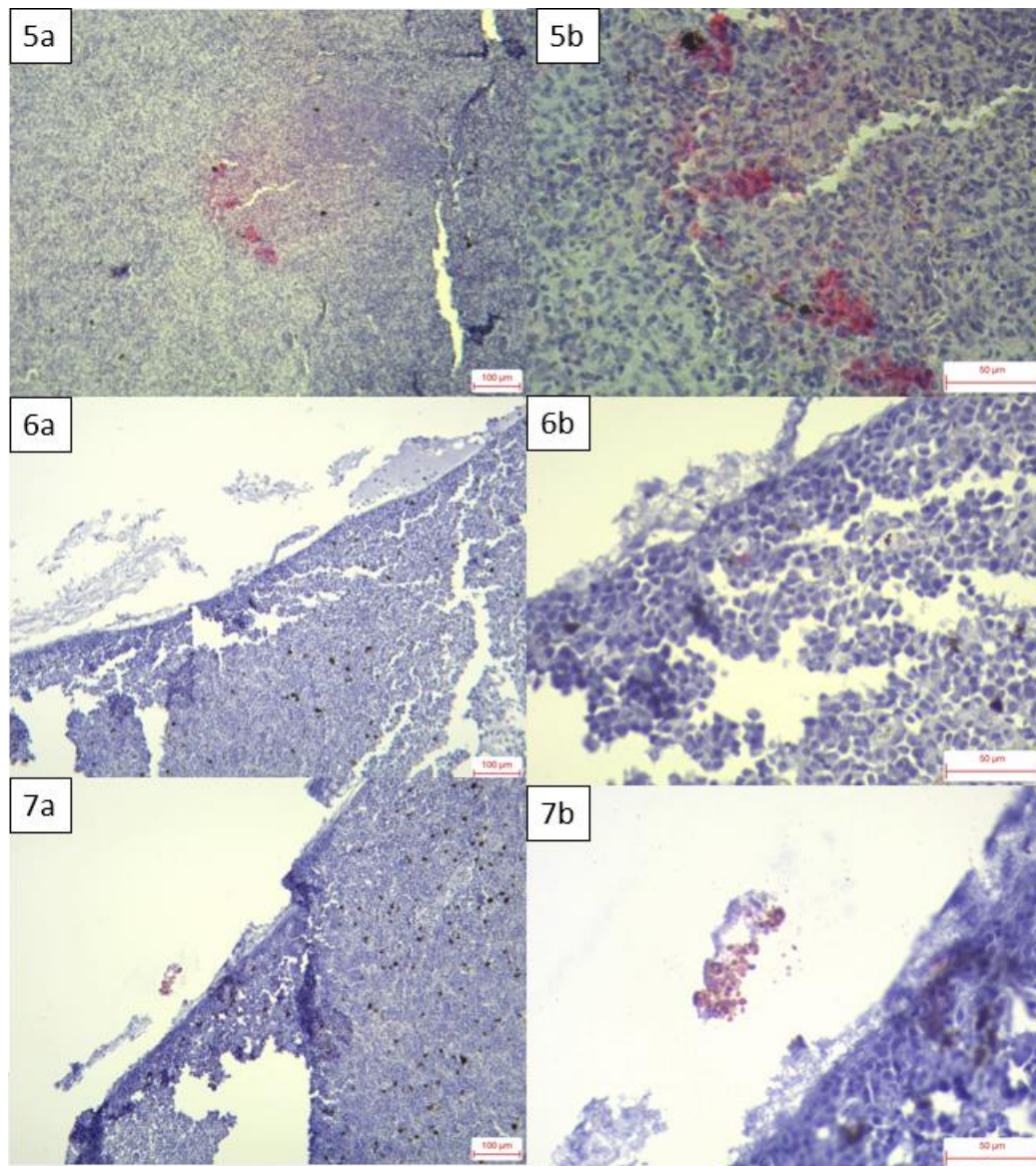
Figur 10 IHC påvisning av *A.salmonicida* i uke 16 (1a, 1b, 1c, 1d) og uke 22 (2a, 2b). Tilstedeværelse av vaksineantigenet synliggjøres med rød farge. Målestokkene er 100 μm ved 10x forstørrelse og 50 μm ved 40x forstørrelse. Snittene har en tykkelse på 5 μm .

Resultatene viser tilstedeværelse av vaksinekomponenten *A.salmonicida* i uke 16 og 22 etter vaksinerings. I resterende uker (uke 12 og 32-74) ble det ikke gjort noen funn. Det ble observert ulik tilstedeværelse i både fettvev og i milt. Det ble gjort funn i totalt 5 individer (n=5) av totalt 28 undersøkte individer.

I Figur 11 er det snitt behandlet med IHC med primærantistoff mot *V.anguillarum* O1 (n=6). I Figur 12 er det snitt behandlet med IHC med primærantistoff mot *V.anguillarum* O2 (n=6). Tilstedeværelse av vaksinekomponent gir en klar rødfarge. Bildene er tatt i forstørrelse 10x og 40x med en målestokk på 100 μm og 50 μm . Tykkelse på snitt er 5 μm .



Figur 11 IHC påvisning av *V.anguillarum* O1 i uke 16 (3a, 3b) og uke 22 (4a, 4b). Tilstedeværelse av vaksineantigenet synliggjøres med rød farge. Målestokkene er 100 μm ved 10x forstørrelse og 50 μm ved 40x forstørrelse. Snittene har en tykkelse på 5 μm .

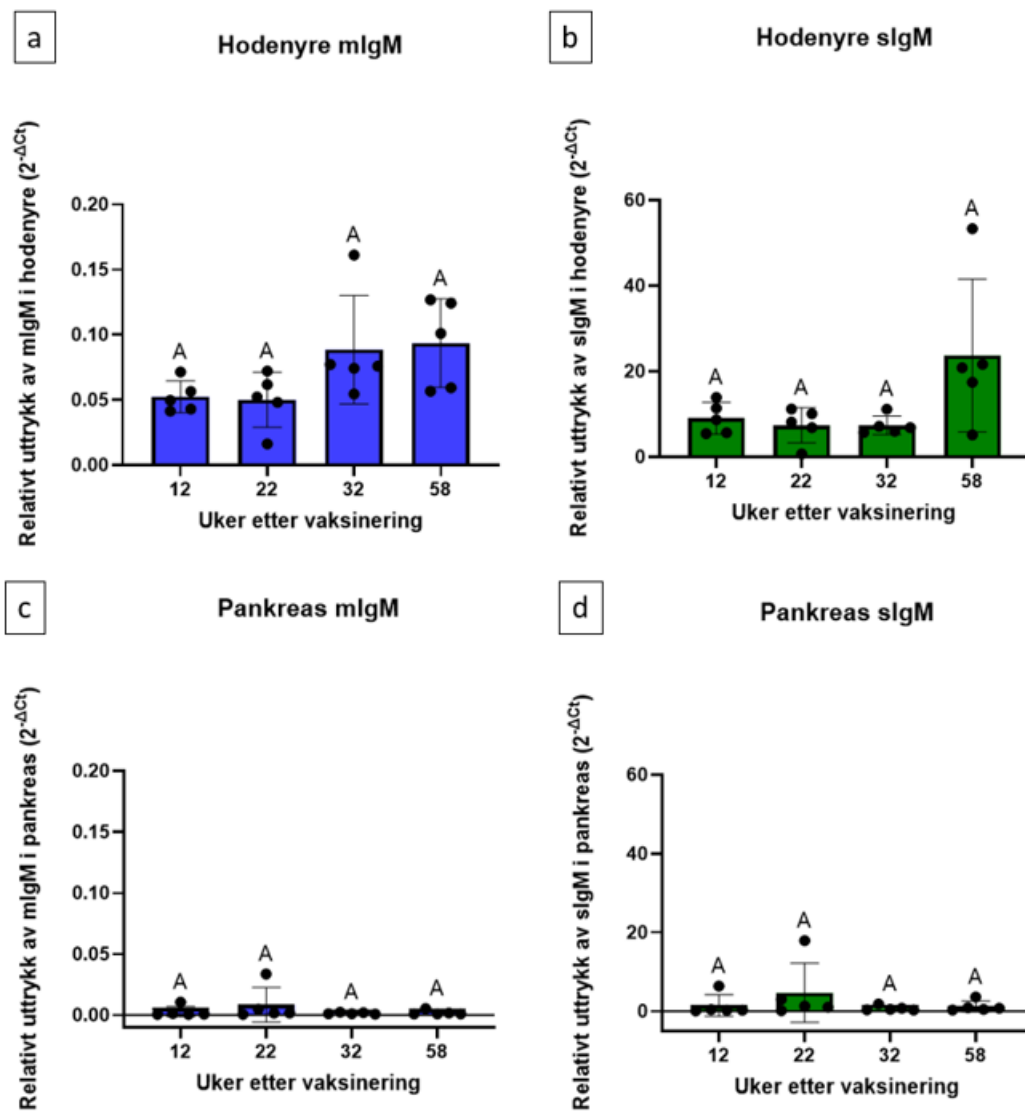


Figur 12 IHC påvisning av *V.anguillarum* O2 i uke 12 (5a, 5b), uke 16 (6a, 6b) og uke 22 (7a, 7b). Tilstedeværelse av vaksineantigenet synliggjøres med rød farge. Målestokkene er 100 µm ved 10x forstørrelse og 50 µm ved 40x forstørrelse. Snittene har en tykkelse på 5 µm.

Resultatene viser tilstedeværelse av vaksinekomponenten *V.anguillarum* O1 i uke 16 og 22 etter vaksining (3a, 3b, 4a, 4b). Det ble ikke gjort noen funn for uke 12. Det ble gjort funn i to individer (n=2) av totalt (n=6) undersøkte. *V.anguillarum* O1 ble observert i vaksinegranulom (kun i uke 16), fettvev og milt. For *V.anguillarum* O2 ble det gjort funn i alle de undersøkte ukene (5a, 5b, 6a, 6b, 7a, 7b) og i alle undersøkte individer (n=6). Det ble observert tilstedeværelse i både fettvev og milt.

3.4 Real-Time PCR

Figur 13 viser relativt genuttrykk ($2^{-\Delta Ct}$) for mIgM og sIgM i hodenyre (a,b) og pankreas (c,d) for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings (n=5). Statistiske forskjeller er vist ved A og B, der ulike bokstaver angir signifikant forskjell $p < 0,05$. Statistisk oversikt er lagt ved i Vedlegg 6.



Figur 13 Relativt genuttrykk ($2^{-\Delta Ct}$) for membranbundet (mIgM) og sekretorisk (sIgM) IgM i hodenyre (a,b) og pankreas (c,d) i uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5). Statistiske forskjeller er vist ved A og B, der ulike bokstaver angir signifikant forskjell $p < 0,05$.

Resultatene viser et tilnærmet likt genuttrykk for mIgM i hodenyre (a) mellom uke 12 og 22 etter vaksinerings. Deretter er det noe høyere verdi i uke 32 og 58. Statistiske analyser viser at det ikke er signifikante forskjeller mellom de ulike ukene. Resultatene viser noe spredning i

individene, og er størst i uke 32 og 58. I uke 32 er det størst spredning med høyeste genuttrykk på 0,161 og laveste 0,054. For sIgM i hodenyre (b) er det en synkende trend fra uke 12 til og med uke 32, før en økning av genuttrykket i uke 58. Statistiske analyser viser ingen signifikante forskjeller i genuttrykk mellom ukene. Det er vist spredning av individene i alle ukene, og i uke 58 er det størst spredning med høyeste genuttrykk på 53,325 og laveste 5,131. I hodenyre var det relative genuttrykket for sIgM mye høyere enn for mIgM i alle uker, med et gjennomsnittlig relativt uttrykk på henholdsvis 11,848 og 0,071 for alle ukene.

Resultatene viser liten variasjon i genuttrykk fra uke 12 til 58 for mIgM i pankreas (c). Det er en liten økning i uke 22. Ved statistiske analyser er det vist ikke signifikante forskjeller mellom ukene. I uke 22 er det ett individ med genuttrykk på 0,030 som er det høyeste målt for alle ukene. For sIgM i pankreas (d) er det en økning i genuttrykk i uke 22 sammenlignet med resterende uker. Uke 12, 32 og 58 har tilnærmet likt genuttrykk. Statistiske analyser viser ingen signifikante forskjeller mellom ukene. Det er noe spredning i individene for ukene, med størst spredning i uke 22 med høyeste genuttrykk på 17,940 og laveste 0,163. I pankreas var det relative genuttrykket for sIgM høyere enn for mIgM i alle uker, med gjennomsnittlig relativt uttrykk på henholdsvis 2,056 og 0,004 for alle ukene.

4 Diskusjon

Oppdrettsnæringen satte for fullt i gang på 1970-tallet i Norge, og er i dag utviklet seg til en stor og viktig næring (Taranger et al., 2015). På 1990-tallet ble det introdusert effektive oljeadjuvansvaksiner som var med på å stabilisere situasjonen rundt bakterielle sykdommer og høyt antibiotikaforbruk (Berg, Bergh, et al., 2006; Brun et al., 2023). For å kunne øke produksjon i framtiden vil man være avhengig av forskning og utvikling av nye og mer effektive vaksiner. Det er fortsatt viktige spørsmål rundt fiskens immunsystem som ikke er besvart, og det er dermed viktig å bruke ressurser på å tilegne ny kunnskap (Bjørngen & Koppang, 2020).

Dette forsøket ga en unik mulighet til å kunne følge vaksinert atlantisk laks over lang tid etter vaksinerings. Laksen ble fulgt frem til 74 uker etter vaksinerings, og det ble totalt gjennomført 10 prøveuttak. Det ble sett på fiskevelferd i form av lengde og vektdata, dødelighet og Spielberg-score. Varighet av immunrespons ble undersøkt ved bruk av histologi, IHC og Real-Time PCR.

4.1 Velferd

Velferd i fiskeoppdrett er blitt satt mer i fokus de siste årene. Det å kunne definere velferd er komplekst, og vil kunne defineres forskjellig basert på mennesker fra ulike bakgrunn (Huntingford & Kadri, 2008). Velferdsindikatorer blir brukt innen oppdrett for å kunne gi en indikasjon på om velferdsbehovene til fisken er møtt eller ikke. Vekst, dødelighet, temperatur og vaksinerelatert patologi er indikatorer som kan si noe om velferd.

4.1.1 Vekst

Resultatene viser en økning i lengde og vekt gjennom de fulgte ukene. Både lengde og vekt steg mest mellom uke 47 og 58 etter vaksinerings. Vekt hadde en nesten tilnærmet lik økning mellom uke 67 og 74. Vekst kan bli påvirket av faktorer som ikke er relatert til velferd og bør derfor ses i sammenheng med andre faktorer slik som stress og sult (Ellis et al., 2002; Turnbull et al., 2005). Vekst er assosiert med fôring og de ernæringsmessige behovene til fisken, og manglende oppfyllelse av disse behovene kan resultere i dårligere vekst. Vekstrate vil også variere avhengig av livsfase og fiskestørrelse (Nilsson et al., 2017).

Ukene med størst stigning var i månedene med høyest sjøtemperatur. På grunn av at laksefisk er vekselvarme spiller temperatur en viktig rolle på vekst. I sjømerder er det vist at laks prøver å unngå temperaturer fra 18 °C og høyere (Oppedal et al., 2011). Den optimale temperaturen for vekst er regnet ut til å være rundt 13 °C (Handeland et al., 2003), og vekst øker med temperatur opp til 14 °C (Austreng et al., 1987). Optimalt bør man produsere laks i sjø på en temperatur mellom 6 – 18 °C (Nilsson et al., 2017). Ved utsett i sjø var sjøtemperaturen på vei nedover, og fortsatte å synke utover vintermånedene. Fisken i dette forsøket hadde to vintre i sjø på temperaturer nede på 3-4 °C.

Lys har påvirkning på vekst og fôring. Første vinter etter utsett ble det brukt lys i merden. Det er vist at fisk utsatt for kontinuerlig lys vokser bedre enn fisk som blir eksponert for naturlig lys og sluttvekt på fisken varierer signifikant. Fisk ved kontinuerlig lys er vist 21 % tyngre ved slakt enn fisk ved naturlig lys (Oppedal et al., 2006). Det er vist at fisk som blir fôret kontinuerlig ikke har større vekst enn fisk som blir fôret bare ved dagslys. Fisk som fikk fôr kun på natta derimot, ble observert å ha en signifikant mindre størrelse. Det er dermed vist at laks spiser aktivt på dagen, men ikke på natta (Thorpe et al., 1988). Dette vil føre til variasjoner i appetitt og antall aktive timer med fôring i løpet av dagen ved sesongvariasjoner.

Vekst vil sannsynlig synke i løpet av vinteren, da det vil bli fôret mindre og kortere tid med lys til å stimulere appetitt. Resultatene stemmer overens med dette da størst vekst ble registrert om sommeren med høye sjøtemperaturer og lang daglengde.

Håndtering og behandling kan føre til stress og skader på fisken, som videre kan påvirke appetitt og vekst. Walde et al. (2022) viste at det en periode etter avlusning er redusert appetitt og vekst. Metoder som termisk og mekanisk avlusning er vist å ha signifikant større negativ effekt på vekst enn medisinsk avlusning (Walde et al., 2022). Avlusning fant sted mellom i uke 54, 60 og 73 etter vaksinerings, der det ble gjennomført tre runder med thermolicer. Det ser ikke ut til at avlusning i dette forsøket hadde betydelig påvirkning på vekst. Det ble ikke gjennomført videre analyser på stressresponser ved håndtering og behandling av fisken, og det er derfor ikke mulig å kunne fastslå en sammenheng med vekst.

Standardavvikene for både lengde og vekt viser at det er stor variasjon mellom individene ved de ulike prøveuttakene. Standardavviket for lengde var størst i uke 58 ($SD=4,105$) og i uke 74 for vekt ($SD= 878,820$). Fisk fra prøveuttak hadde generelt sett høyere registrert lengde og vekt enn hva som var rapportert i besøksrapportene. Det ble kun tatt lengde og vekt fra 20 fisk ved hvert uttak, noe som er et veldig lite utvalg sammenlignet med totalt antall individer i merden. Individene tatt ut for prøveuttak ble avlivet, og dermed er det også ulike fisk som blir veid og målt ved hvert prøveuttak. I et forsøk av Nilsson & Folkedal (2019) er det vist at det å få et representativt utvalg når det kommer til lengde og vekt er svært vanskelig. Nøyaktighet økte med større antall individer tatt ut til prøveuttak. Når kun et utvalg blir målt vil tilfeldigheter kunne spille inn, og store eller små individer kan være overrepresentert. Fangstmetode kan også spille inn på utvalget av fisk man får tatt ut. Resultatene viste at ved en prøveuttaksstørrelse på rundt 100 individer startet det å stabilisere seg mot det sanne gjennomsnittet (Nilsson & Folkedal, 2019). Basert på dette er antall individer tatt ut ved dette forsøket et veldig lite utvalg av all fisken som befinner seg i merden. Det vil dermed være naturlig at registrerte resultater i dette forsøket vil avvike fra det reelle gjennomsnittet.

4.1.2 Dødelighet

Dødelighet er den mest brukte velferdsindikatoren (Gismervik et al., 2024) og vil være en indikator på forhold som er relatert til redusert velferd (Stien et al., 2013). Resultatene viser akkumulert dødelighet som ender på 9,65 % for lokaliteten, og 12,3 % for fulgt fiskegruppe etter 15 måneder i sjø. Dette er under den rapporterte akkumulerte dødeligheten i Fiskehelse rapporten for 2023 på 16,7 % på landsbasis. I produksjonsområde 10 som dette forsøket ble gjennomført var registrert akkumulert dødelighet i sjø 13,9 % (Sommerset et al., 2024b). Fulgt fiskegruppe var enda ikke slaktet ut ved forsøkets slutt, så man vil anta at den akkumulerte dødeligheten vil stige noe før utslakt. Fra uke 22 etter vaksinerings og videre utover har fulgt fiskegruppe større akkumulert dødelighet enn lokaliteten. Dette samsvarer med sykdomshistorikken til fulgt merd, der det ble påvist IPNV på samtlige undersøkte fisk uke 22 etter vaksinerings.

For den fulgte fiskegruppen er det to svingninger på grafen, med oppstart av første topp i uke 22 etter vaksinerings som samsvarer med påvist IPNV, og en svingning som starter mellom uke 47 og 58 etter vaksinerings i samsvar med oppstart av lusebehandling. Ved utprøving av ulike avlusningsmetoder (termisk, mekanisk og ferskvann) er det blitt vist redusert velferd i alle grupper gjennom forsøket (Bui et al., 2023). Ved termisk avlusning blir fisken pumpet inn i et vannbad med temperaturer mellom 28-34 °C og holdes der i 20-30 sekunder. Denne metoden baserer seg på prinsippet om at lakselusa vil bli påvirket av de høye temperaturene raskere enn fisken og at den vil inaktiveres og falle av (Grøntvedt et al., 2015; Roth, 2016). For termisk avlusning har det vært stor variasjon i dødelighet, noe som sannsynligvis skyldes en forbedring i teknikken de siste årene (Walde et al., 2021). Faktorer slik som trengetid og pumpe system har vært noen av utfordringene med metoden (Grøntvedt et al., 2015). I et forsøk av Overton et al. (2019) er det vist at termisk avlusning forårsaket økt dødelighet ved 33 % av behandlingene, etterfulgt av mekanisk (25 %) og hydrogenperoksid (21 %). Faktorer som fiskestørrelse og temperatur påvirket dødeligheten, og for termisk behandling økte dødeligheten ved lave temperaturer i sjø på 4-7 °C og høye temperaturer på 13-16 °C (Overton et al., 2019). Siste avlusning på fisk fulgt i dette forsøket ble gjennomført innenfor temperaturområdet der det er blitt rapportert om økt dødelighet. Etter alle avlusninger ble det registrert forøket dødelighet og en velferdsscore på 1 (akseptabel), og det ble rapportert om mekaniske skader/sår. IPN og HSMB blir også registrert som årsak til dødelighet i perioden. Basert på disse rapportene kan man anta at avlusning påvirket dødeligheten i merden. På

grunn av påvist sykdom og allerede sår/mekaniske skader ved andre og tredje behandling vil fisken også være mindre robust for videre håndtering og stress. For lokaliteten er det ikke like tydelige svingninger i akkumulert dødelighet, men man kan se en økning etter uke 74. Ifølge besøksrapport skyldes dette hjerterelatert sykdom (HSMB og CMS) og vintersår.

4.1.3 Speilberg

Norsk oppdrettslaks blir vaksinert før de blir overført til sjø i den hensikt å begrense tap forårsaket av laksesykdommer slik som furunkulose, vibriose og kaldtvannsvibriose. I dag blir fisken ofte vaksinert intraperitonealt med vaksiner som inneholder oljeadjuvanser, og disse har vist å kunne gi bivirkninger slik som sammenvoksinger (Drangsholt et al., 2011; Sommerset et al., 2005). Speilberg-score blir brukt til å vurdere alvorlighetsgraden av vaksineinduserte sammenvoksinger i fisk, og blir mye brukt i norsk akvakultur som indikator på velferd (Nilsson et al., 2017). Globalt sett er det hos atlantisk laks disse sammenvoksingene er et problem. Det er observert færre og mer moderate sammenvoksinger hos regnbueørret, noe som tyder på forskjeller mellom nært beslektede familier. Dette fenomenet kan delvis forklares ved at vaksiner til regnbueørret vanligvis inneholder færre antigener enn de som brukes til laks. I tillegg er det noen vaksiner som ikke inneholder adjuvans, og vil dermed være mindre irriterende for fisken (Poppe & Koppang, 2014).

Resultatene fra dette forsøket viser vaksineinduserte sammenvoksinger i samtlige undersøkte fisk fra uke 22 til 74 etter vaksinerings. Alle uker hadde individer med score 1 og 2. Uke 32 etter vaksinerings er første uke med registrert score på 3, og fisk fra uke 40, 67 og 74 fikk også score 3. Dette indikerer at de vaksineinduserte sammenvoksingene holder seg i like høy alvorlighetsgrad i lang tid etter vaksinerings. Uke 74 hadde høyeste gjennomsnittsscore, og er signifikant fra uke 22 ($p < 0,0384$). Dette indikerer at vaksineinduserte sammenvoksinger i dette forsøket økte noe over tid. Våre resultater stemmer overens med feltforsøk gjennomført av Midtlyng (1996) der ble det observert at fisk injisert med vaksine med oljeadjuvans hadde vaksineinduserte sammenvoksinger helt frem til slakt og at sammenvoksingene ble verre med økende tid siden vaksinasjon (Midtlyng, 1996). I et forsøk av Poppe & Breck (1997) ble det observert sammenvoksinger hos fisk 12 måneder etter vaksinasjon (Poppe & Breck, 1997). Dette støttes også opp ved Berg et al (2006) som også observerte at sammenvoksingene varte gjennom hele produksjonssyklusen (Berg, Rødseth, et al., 2006). I et annet forsøk i kar med Midtlyng et al. (1996) ble det observert en økning i Speilberg-score gjennom alle prøvetakene

fra 6 uker til 6 måneder etter vaksinerings. Her ble fisken holdt i tanker med ferskvann på temperaturer mellom 10 °C og 12 °C gjennom hele forsøket.

Andre studier har vist at vaksineinduserte sammenvoksinger har en sammenheng med temperatur, der graden av sammenvoksinger øker på sommeren og høsten (Berg, Rødseth, et al., 2006). I et forsøkt av Drangsholt et al. (2011) ble det observert vaksinebivirkninger gjennom hele forsøket, men fisk evaluert 6 måneder etter sjøsetting hadde større sammenvoksinger enn fisk evaluert 12 måneder etter sjøsetting. I følge Mutoloki et al (2004) var intraabdominale scoringer lav gjennom hele forsøket med en score fra 1-3. Dette stemmer overens med våre resultater. Bivirkningene derimot hos de fleste fulgte gruppene økte frem til seks måneder etter vaksinerings, for deretter å avta (Mutoloki et al., 2004). Alle de nevnte forsøkene viser at bivirkninger etter vaksinerings vedvarer over lang tid etter vaksinasjon. Ved hvilke tidspunkt bivirkningene er størst varierer noe, men kan skyldes naturlige variasjoner mellom individer eller variasjoner i administrert vaksine.

Ifølge pakningsvedlegget er det svært vanlig (flere enn 1 av 10) med milde sammenvoksinger på score 1-2. Det er vanlig (flere enn 1 men færre enn 10 av 100) med moderate sammenvoksinger med score 3. Høyere score enn dette rangert som alvorlige sammenvoksinger blir rapportert å være svært sjeldne (færre enn 1 av 10000) (PHARMAQ, 2020). Dette stemmer overens med Speilberg-scoringen som er gjort i dette forsøket, med forbehold om svært få undersøkte individer. I dette forsøket ble det gjennomført en modifisert Speilberg-scoring av en enkelt person. Alle individer ble rangert ved hjelp av bilder i ettertid av prøveuttak. Scoring som er gitt er subjektiv, og kan legge til rette for over og undertolkning.

Oppsummering velferd

Temperatur, lys og håndtering er faktorer som kan påvirke vekst hos fisk. I dette forsøket så man at temperatur og lys var med på å påvirke vekst mellom de ulike uttakene, der fisken vokste mest på sommeren ved høye temperaturer i sjø og gode lysforhold. Dødelighet i den fulgte fiskegruppen ble påvirket av sykdom og avlusning. Vaksinerelatert patologi ble observert gjennom hele perioden fisken ble fulgt i sjø. Observerte sammenvoksinger indikerer at bivirkninger vedvarer over lang tid etter vaksinasjon og at vaksinebivirkningene er like omfattende etter lang tid i sjø. Det ble registrert Speilberg-score på 3, som regnes som en uønsket høy score.

4.2 Antistoffrespons - ELISA

Mengde antistoff i blodet mot de induserte antigenene i vaksinen vil kunne si noe om vaksinerespons. Fisk med høy antistoffrespons vil kunne være bedre rustet til å bekjempe en eventuell infeksjon (Munang'adu et al., 2014).

Våre resultater viser en signifikant økning i antistoffrespons helt frem til uke 74 etter vaksinerings får både *A.salmonicida* og *V.anguillarum* sammenlignet med uvaksinert fisk. For begge bakteriene ser man en nedgang i uke 74 etter vaksinerings, men *V.anguillarum* viser en mye større variasjon gjennom hele forsøket, og en mye lavere antistoffrespons ved siste uttak. *A.salmonicida* ble fortynnet 1:3200 og *V.anguillarum* ble fortynnet 1:1600, men likevel viste resultatene høyere OD-verdier for *A.salmonicida* ved alle uttak etter vaksinerings. Det ble også observert større spredning blant individene for *V.anguillarum*. Individforskjeller i antistoffrespons hos vaksinert fisk er ikke uvanlig og er observert ved fisk vaksinert intraperitoneal mot furunkulose (Erdal & Reitan, 1992). De observerte variasjonene mellom individene kan være grunnet naturlige forskjeller, men også ulik deponering av vaksinen. Ved store variasjoner mellom individer vil det kunne gå utover flokkimmuniteten, og dermed gi redusert total beskyttelse. Det er i dette forsøket undersøkt få individer, og et større antall fisk burde vært analysert for å se nærmere på individvariasjoner. Det ser ikke ut til at lave temperaturer eller sesongvariasjoner hadde påvirkning på antistoffresponsen i dette forsøket.

I tidligere studier er det vist funn av antistoff mot *A.salmonicida* frem til 27 uker etter vaksinerings med en monovalent olje-adjuvansvaksine (Eggset et al., 1997). Midtlyng et al. (1996) observert også at fisk vaksinert med olje-adjuvansvaksine var beskyttet gjennom hele forsøkets varighet frem til 6 måneder og beskyttelse økte med tid. Bare vaksine med mineral-oljeadjuvans har vist å gi en holdbar beskyttende immunitet mot furunkulose (Midtlyng et al., 1996). Det er blitt observert spesifikk antistoffrespons mot *A.salmonicida* 9 måneder etter vaksinerings (Bricknell et al., 1999). I et annet studie ble laks vaksinert med ulike mono- eller polyvalente vaksiner mot salmonid rickettsial septicaemia (SRS) og ILA. Antistoffresponsen ble opprettholdt i 6 måneder med høyeste konsentrasjon ved ca. 2 måneder (Tobar et al., 2015). I et forsøk med piggvar vaksinert mot *V.anguillarum* ble det vist høyere antistoffrespons i 160 dager (ca. 5 måneder) etter vaksinasjon sammenlignet med uvaksinert fisk (Torres-Corral et al., 2021).

Det er rapportert om minst 12 måneder immunitet mot bakterielle antigener etter vaksinerings i pakningsvedlegget (PHARMAQ, 2020). Mye tyder på at antistoffer er den mest pålitelige indikasjon på beskyttende immunitet etter vaksinerings (Munang'andu & Evensen, 2019). Man kan ikke si sikkert om data for antistoffrespons i dette forsøket er relatert til beskyttelse mot sykdom. Smitteforsøk burde vært gjennomført for å kunne si noe om immunitet etter vaksinerings.

Tilstedeværelse av spesifikke immunglobuliner tyder på at vaksinen har induisert det medfødte immunsystemet med antigengjenkjenning og presentasjon. Deretter aktivering av det adaptive immunforsvaret med aktivering av Th-celler og modning og ekspansjon av B-celler (Secombes & Belmonte, 2016). Ved den observerte høye antistoffresponsen mot *A.salmonicida* og *V.anguillarum* gjennom 74 uker etter vaksinerings indikerer at man har fått dannelse av hukommelsesceller og langlivede plasmaceller i hodenyre som skiller ut antistoffer over lang tid. Hos mennesker er halveringstiden for mIgM 5-6 dager i serum (Flaherty, 2012). For regnbueørret og coho-laks er det vist at halveringstid for mIgM er på rundt 2 dager (Voss et al., 1980; Ye et al., 2010). Dette tyder på at den lange antistoffresponsen i forsøket kommer fra produksjon og sekresjon av IgM.

Plateforskjeller for individer

Optimalt sett skulle plater for individer ha blitt normalisert for å kunne sammenligne ulike plater med hverandre. Platene ble ikke normalisert på grunn av variasjoner i PK mellom platene ved samme fortykning. Resultatene ble likevel presenter i graf, da duplikate brønner samsvarte med hverandre, og blank var negativ for alle plater. Indirekte ELISA består av mange steg og det er dermed mange faktorer som kan spille inn på registrert antistoffrespons. Slike forskjeller i PK som i utgangspunktet skal være lik kan skyldes blant annet variasjoner ved tillaging av plater, opptining av PK og pipeteringsforskjeller. Det vil mulig ha oppstått forskjeller i temperatur ved inkubering i RT, da ulike plater ble kjørt etter hvert som prøveuttak ble gjennomført. Dermed er noen plater kjørt på sommeren og noen på vinteren som vil kunne føre til forskjeller. Også inkuberingstid kan variere noe, selv om angitt tid er prøvd overholdt så nøyaktig som mulig. Det ble blant annet utløst brannalarm ved to anledninger ved inkubering av plater, og dermed ble inkuberingstid oversteget. PK som er brukt i forsøket er hentet fra ulike eppendorfrør. Det vil dermed være forskjeller i hvor mange ganger prøven er tint. En annen faktor som kan føre til variasjoner i platene er pipettering.

Dårlig teknikk og forurensning av brønner kan være faktorer som spiller inn. *V.anguillarum* ble dyrket i flere omganger, og det kan dermed være variasjoner i OD-verdi på bakterieløsningen som er brukt (Strandskog, personlig kommunikasjon, mars 2024). I ettertid er det vanskelig å påvise årsak, men uavhengig av dette vil resultatene presentert for individer muligens være noe mindre nøyaktige enn for pools.

Oppsummering antistoffrespons

Det ble observert signifikante forskjeller i alle ukene sammenlignet med uvaksinert fisk. Antistoffresponsen vedvarte frem til forsøkets slutt ved 74 uker etter vaksinasjon. Dette indikerer at antistoffresponsen holdes over lang tid, og man kan anta at vaksinen har oppnådd en adaptiv immunrespons og fått dannet hukommelsesceller og langlivede plasmaceller. Om den observerte antistoffresponsen i dette forøket vil føre til tilstrekkelig beskyttelse er uvisst, da det ikke ble gjennomført smitteforsøk.

4.3 Histologi

4.3.1 Vaksinegranulomer

For å forbedre og forleng immunrespons blir oljeadjuvanser brukt sammen med antigenene i vaksinen. Dette har vist å fremkalle lokale inflammatoriske responser, og i sammenheng med disse er det funnet vaksinegranulomer (Bruno et al., 2013b).

Resultatene viste vaksinegranulomer i uke 12, 16 og 22 etter vaksinerings. Det ble ikke funnet granulomer ved senere tidspunkt. I uke 16 hadde samtlige undersøkte fisk (n=5) vaksinegranulomer, og var den uken med størst forekomst.

Mutoloki et al. (2004) observerte vaksinegranulomer inntil 12 måneder etter vaksinerings. Samme funn ble også gjort av (Mutoloki et al., 2006). I et studie av Poppe & Breck (1997) ble det observert vaksinegranulomer i 10 måneder etter vaksinerings. Alle disse studiene hadde en høyere vaksinedose enn i dette forsøket, som kan være med å påvirke varighet og grad av bivirkninger. I dette forsøket ble det funnet vaksinegranulomer i forbindelse med fettvev, samt fettvev i tilknytning til milt og pankreas, noe som stemmer overens med tidligere observasjoner.

Sett i sammenheng med Speilberg-scoring gjort i dette forsøket, er funn av granulomer ikke i samsvar med vaksineinduserte sammenvoksinger. Ifølge Berg et al. (2006) er det en klar sammenheng mellom immunreaksjon og sammenvoksinger. Grunnen til at det ikke ble funnet vaksinegranulomer ved senere uttak kan skyldes ulike årsaker. Uke 32 og 40 etter vaksinerings ble fiksert feil, og man opplevde dermed dårlig kvalitet og autolyse på disse snittene. Andre faktorer som kan spille inn er individforskjeller og økende fiskestørrelse der sjansen for å treffe på deponisted minsker. Vevsbitene tatt ut til histologi var en veldig liten del av vevsprøven som ble tatt ut, og muligens ikke representativ.

4.3.2 Immunhistokjemi

Ved IHC ble fettvev, milt, pankreas og hodenyre undersøkt for å oppdage og lokalisere spesifikke antigener. Det ble det brukt primærantistoff mot vaksinekomponentene *A.salmonicidal*, *V.anguillarum* O1 og *V.anguillarum* O2.

Resultatene viste farging av *A.salmonicida* i uke 16 og 22. I uke 12 og 32-74 ble det ikke gjort noen funn. For *V.anguillarum* ble det bare farget snitt fra uke 12, 16 og 22 på grunn av

tidsmangel og arbeidsmengde. For *V.anguillarum* O1 ble det vist tilstedeværelse av vaksinekomponenten i uke 16 og 22. Det ble ikke gjort noen funn i uke 12. For *V.anguillarum* O2 ble det vist tilstedeværelse i uke 12, 16 og 22. Det ble gjort funn i både fettvev og milt. *V.anguillarum* O1 var det eneste antigenet som ble påvist i vaksinegranulom, og ble funnet kun i uke 16.

Oljeadjuvansen er med på å bidra til en sakte og jevn frigivelse av antigenene i vaksinen til nærliggende vev og skaper en depoteffekt som varer over tid (Herbert, 1968). Mutoloki et al. (2004) antydte at antigener på injeksjonsstedet kunne ha en stimulerende effekt på inflammasjon og induserer og opprettholder den inflammatoriske responsen som til slutt fører til uønskede bivirkninger slik som sammenvoksinger (Mutoloki et al., 2004). Tilstedeværelse av *A.salmonicida* ble ikke påvist i vaksinegranulom i dette forsøket. I andre studier har *A.salmonicida* antigener blitt påvist i granulomer inntil 12 måneder etter vaksinasjon (Haugarvoll et al., 2010; Mutoloki et al., 2004). Det ble gjort funn av både *A.salmonicida* og *V.anguillarum* i milt. Mutoloki et al. (2004) observerte *A.salmonicida* antigener i hodenyre og milt frem til 24 uker (6 måneder) etter vaksinerings. Dette stemmer overens med resultater fra dette prosjektet, da det ble funnet tilstedeværelse av *A.salmonicida* i milt frem til 22 uker etter vaksinerings.

Oppsummering histologi og IHC

Det ble ikke observert vaksinegranulomer etter uke 22 etter vaksinerings. Tidligere studier tilsier at granulomer vanligvis skal forekomme over lengre tid etter vaksinerings, og ses ofte i sammenheng med den inflammatoriske responsen. Ved IHC ble bare *V.anguillarum* O1 lokalisert i sammenheng med vaksinegranulom. Det ble gjort funn i milt og fettvev for alle testede antigener. *A.salmonicida* og *V.anguillarum* O1 ble lokalisert i uke 16 og 22 og *V.anguillarum* O2 i uke 12, 16 og 22 etter vaksinerings.

4.4 Real-Time PCR

Real-Time PCR ble brukt til å detektere mIgM og sIgM fra hodenyre og pankreas fra uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Resultatene viste ingen signifikante forskjeller mellom ukene i verken hodenyre eller pankreas. Det relative genuttrykket for sIgM i hodenyre var mye høyere enn for mIgM i alle uker, med et gjennomsnittlig relativt uttrykk på henholdsvis 11,848 og 0,071 for alle ukene. I pankreas var det relative genuttrykket for sIgM høyere enn for mIgM i alle uker, med gjennomsnittlig relativt uttrykk på henholdsvis 2,056 og 0,004 for alle ukene.

I uke 22 var det en økning i genuttrykket av sIgM i pankreas, og samtidig gikk genuttrykket av sIgM noe ned i hodenyre. Ved uke 58 gikk det relative genuttrykket av sIgM i hodenyre opp igjen, og man ser at i pankreas går det ned. Dette kan muligens forklares ved at det vil strømme B-celler til infeksjonsstedet, og deretter aktiviseres til plasmaceller som transporteres tilbake til hodenyren og starter å skille ut antistoffer eller blir til hukommelsesceller som gir langvarig immunitet (Secombes & Belmonte, 2016; Zwollo et al., 2005). Det kan dermed virke som at det er en sammenheng mellom sIgM i pankreas og hodenyre, der den ene øker og den andre minsker i forhold til hverandre. Denne observerte endringen i genuttrykk i pankreas i uke 22 etter vaksinerings samsvarer med påvist IPNV i samme uke.

Det relative genuttrykket i hodenyre av sIgM er høyere enn sIgM i pankreas. Dette kan muligens forklares ved at hodenyre er et primært lymfoid organ (Hansen & Zapata, 1998) og modning av B-celler skjer i hodenyren som videre produserer immunglobuliner (Irwin & Kaattari, 1986; Secombes & Belmonte, 2016). De sekretoriske immunglobulinene fra hodenyre vil bli skilt ut i fiskens sirkulasjonssystem (Secombes & Belmonte, 2016). Dette vil kunne forklare at mengden sIgM blir oppregulert i hodenyre etter vaksinerings i større grad enn i pankreas som er undersøkt i dette forsøket. Dette støtter opp om at hodenyre er ansvarlig for den langsiktige sekresjonen av IgM. I et smitteforsøk ble halvparten av smolt i et kar infisert med PRV ved injeksjon. Etter 10 uker ble det observert en oppregulering av mIgM og sIgM i hodenyre (Johansen et al., 2016). Resultatene i forsøket indikerer at fisk smittet med virussykdommer vil kunne få en aktivering av det adaptive immunsystemet. Hos den fulgte fiskegruppen i dette forsøket ble det påvist HSMB i uke 40 etter vaksinerings. Det ble observert økning i sIgM i hodenyre i uke 58. Om påvisning av IPNV og HSMB hadde en innvirkning på observerte endringer i genuttrykk av IgM er vanskelig å si da man ikke vet om

utvalgt fisk var smittet i det hele tatt. Det er også undersøkt et veldig lite antall fisk i dette forsøket. Det er viktig å merke seg at antall individer undersøkt for Real-Time PCR (n=5) for hvert prøveuttak er veldig få, og muligens ikke representativt.

I et studie av Jenberie et al. (2020) ble det observert en lokal IgM immunrespons i bukhulen etter infeksjon med Salmonid alfavirus (SAV3) intraperitonalt. Det er også vist at rognkjeks ved vaksinerings intramuskulært fikk en økning i genuttrykk av mIgM og sIgM ved 21 og 42 dager etter vaksinerings i hud/muskel. Dette indikerer at vaksinasjon setter i gang en lokal IgM produksjon ved injeksjonsstedet (Erkinharju et al., 2019). I et annet studie ble det observert at genuttrykket av immunglobuliner var høyere for vaksinert fisk sammenlignet med uvaksinert fisk allerede ved 1 dag etter vaksinerings. Forskjellen nådde en topp ved 14 dager etter vaksinasjon (Lund et al., 2019).

Oppsummering Real-Time PCR

Resultatene viste et høyere genuttrykk av mIgM og sIgM i hodenyre sammenlignet med pankreas. Dette kan mest sannsynlig forklares ved at hodenyre er et primært lymfoid organ. Det ble observert en økning i genuttrykk i uke 22 etter vaksinerings i pankreas, noe som trolig kan knyttes til påvisning av IPN som rammer organet.

5 Konklusjon

Velferdsindikatorer

- Fisken hadde en økning i vekst gjennom hele forsøket. Temperatur og lys var med på å påvirke vekst mellom de ulike uttakene.
- Endringer i dødelighet ble påvirket hovedsakelig av sykdom og avlusning. Dødelighet var normal/som forventet ved forsøkets slutt.
- Vaksineinduserte sammenvoksinger varte gjennom hele forsøksperioden, og var like omfattende etter 15 måneder i sjø.

Antistoffrespons

- Det ble påvist høy antistoffrespons for både *A.salmonicida* og *V.anguillarum* gjennom hele forsøkets varighet.

Histologi

- Det ble funnet vaksinegranulomer frem til uke 22 etter vaksinerings.

Immunhistokjemi

- *A.salmonicida* og *V.anguillarum* O1 ble påvist i fettvev og milt i uke 16 og 22 etter vaksinerings
- *V.anguillarum* O2 ble påvist i fettvev og milt i uke 12, 16 og 22 etter vaksinerings.
- *V.anguillarum* O1 ble påvist i vaksinegranulom i uke 16 etter vaksinerings.

Real-Time PCR

- Real-Time PCR viste høyere genuttrykk av mIgM og sIgM i hodenyre sammenlignet med pankreas. I pankreas var det en økning i genuttrykk i uke 22 som indikerer en lokal IgM produksjon.

6 Referanser

- Abós, B., Bailey, C., & Tafalla, C. (2022). Adaptive Immunity. In K. Buchmann & C. J. Secombes (Eds.), *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection* (pp. 105-140). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1>
- Austreng, E., Storebakken, T., & Åsgård, T. (1987). Growth Rate Estimates for Cultured Atlantic Salmon and Rainbow Trout *Aquaculture* 60(2), 157-160. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90307-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90307-3)
- Bassity, E., & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One*, 7(3), e33196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033196>
- Berg, A., Bergh, Ø., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Juell, J. E., & Nerland, A. (2006). *Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk – effekter og bivirkninger* (Fisken og havet nr. 9 - 2006). https://www.hi.no/resources/publikasjoner/fisken-og-havet/74729/nr.9_2006_dyrevelferdsmessige_konsekvenser_vaksinasjon_av_fisk_effekter_og_bivirkninger.pdf
- Berg, A., Rødseth, O. M., Tangerås, A., & Hansen, T. (2006). Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69(2-3), 239-248. <https://doi.org/10.3354/dao069239>
- Bjørngen, H., & Koppang, E. O. (2020). Immunorganer hos fisk. *Naturen*, 144(5), 160-163. <https://doi.org/10.18261/issn.1504-3118-2020-05-02>
- Bjørngen, H., & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 73, 53-63. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01196-0>
- Bolger, T., & Connolly, P. L. (1989). The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, 34(2), 171-182. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03300.x>
- Bowden, T. J., Cook, P., & Rombout, J. H. W. M. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(5), 413-427. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.02.003>
- Bricknell, I. R., King, J. A., Bowden, T. J., & Ellis, A. E. (1999). Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. *Fish & shellfish immunology*, 9(2), 139-151. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0183>
- Brun, E., Calquhun, D., Garseth, Å. H., Grave, K., Gulla, S., Hansen, H., Helgesen, K. O., Patel, S., Stige, L. C., & Tavoranpanich, S. (2023). Driftsrutiner – en driver for nye bakterieinfeksjoner. *Fiskehelse rapporten 2022, Rapport 5a/2023*, 27-28. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelse rapporten-2022>
- Bruno, D. W., Noguera, P. A., & Poppe, T. T. (2013a). Functional Anatomy. In *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (2 ed., pp. 5-26). Springer Dordrecht Heidelberg New York London. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2010-7>
- Bruno, D. W., Noguera, P. A., & Poppe, T. T. (2013b). Vaccination Side-Effects. In *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (2 ed., pp. 155). Springer Dordrecht Heidelberg New York London. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2010-7>

- Bui, S., Skern, R., & Saito, T. (2023). Optimising delousing strategies: developing best practice recommendations for maximal efficacy and positive welfare. *Rapport fra havforskningen*. <https://hdl.handle.net/11250/3085619>
- Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2019). Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*, 7(12), 627. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120627>
- Bøggwald, J., & Dalmo, R. A. (2020). Historisk blikk – og nåværende vaksiner i norsk fiskeoppdrett. *Naturen*, 144(5), 207-213. <https://doi.org/10.18261/issn.1504-3118-2020-05-09>
- Colquhoun, D. J., & Lillehaug, A. (2014). Vaccination against Vibriosis. In R. Gudding, A. Lillehaug, & E. Øystein (Eds.), *Fish Vaccination* (pp. 172-184). John Wiley & Sons, Incorporated. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch15>
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.025>
- Dalmo, R., Bøggwald, J., & Tafalla, C. (2016). Adjuvants and Delivery Methods: Current and Novel. In A. Adams (Ed.), *Fish Vaccines* (Vol. 1, pp. 75-103). Springer Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_4
- Dalmo, R. A., Ingebriksen, K., & Bøggwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 241-273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x>
- Dawkins, M. S. (1998). Evolution and Animal Welfare. *The Quarterly Review of Biology*, 73(3), 305-328. <https://doi.org/10.1086/420307>
- Drangsholt, T. M. K., Gjerde, B., Ødegård, J., Fridell, F., & Bentsen, H. B. (2011). Quantitative genetics of vaccine-induced side effects in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 318(3), 316-324. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.044>
- Duncan, I. J. H. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 24(2), 483-492. <https://doi.org/10.20506/rst.24.2.1587>
- Dyrevelferdsloven. (2009). Lov om dyrevelferd. <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-97?q=dyrevelferdsloven>
- Eggset, G., Mikkelsen, H., & Killie, J.-E. A. (1997). Immunocompetence and duration of immunity against *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at low and high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology*, 7(4), 247-260. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0080>
- Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., & Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 493-531. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00893.x>
- Erdal, J. I., & Reitan, L. J. (1992). Immune response and protective immunity after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2(2), 99-108. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(05\)80039-7](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(05)80039-7)
- Erkinharju, T., Strandskog, G., Vågnes, Ø., Hordvik, I., Dalmo, R. A., & Seternes, T. (2019). Intramuscular vaccination of Atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) induces inflammatory reactions and local immunoglobulin M production at the vaccine administration site. *Journal of Fish Diseases*, 42(12), 1731-1743. <https://doi.org/10.1111/jfd.13101>

- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A., & Ross, N. W. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(3), 645-657. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00109-5)
- Flaherty, D. (2012). Antibodies. In *Immunology for Pharmacy* (pp. 70-78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10009-4>
- FOU. (2022). The State of Word Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Roma, FOU. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34(9), 643-661. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Frey, J. (2007). Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine*, 25(30), 5598-5605. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.058>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Garseth, Å. H., Furnesvik, L., & Hansen, H. (2024). Helsestatus hos vill fisk. *Fiskehelse rapporten 2023, Rapport 8a/2024*, 218-237. <https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2024/fiskehelse rapporten-2023>
- Gismervik, K., Nielsen, K. V., Bjørklund, K., Osnes, M. N., Gåsnes, S., Stige, L. C., Qviller, L., Furnesvik, L., & Harasimczuk, E. (2024). Fiskevelferd. *Fiskehelse rapporten 2023, Rapport 8a/2024*, 55-59. <https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2024/fiskehelse rapporten-2023>
- Grefsrud, E. S., Andersen, L. B., Grøsvik, B. E., Karlsen, Ø., Kvamme, B. O., Hansen, P. K., Sandlund, N., Stien, L. H., & Solberg, M. F. (2023). Risikoreport norsk fiskeoppdrett 2023—Produksjonsdødelighet hos oppdrettsfisk og miljøeffekter av norsk fiskeoppdrett. *Rapport fra havforskningen*. <https://www.hi.no/templates/reporteditor/report-pdf?id=66910&80925291>
- Grimholt, U., Hordvik, I., Fosse, V. M., Olsaker, I., Endresen, C., & Lie, Ø. (1993). Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Immunogenetics*, 37(6), 469-473. <https://doi.org/10.1007/BF00222473>
- Grøntvedt, R. N., Nerbøvik, I.-K. G., Viljugrein, H., Lillehaug, A., Nilsen, H., & Gjevne, A.-G. (2015). Termisk avlusning av laksefisk - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt *Veterinærinstituttets rapportserie, Rapport 13*. <https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2015/termisk-avlusning-av-laksefisk-dokumentasjon-av-fiskevelferd-og-effekt>
- Gulla, S. (2024). Bakteriesykdommer hos laksefisk i oppdrett. *Fiskehelse rapporten 2023, Rapport 8a/2024*, 138-139. <https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2024/fiskehelse rapporten-2023>
- Handeland, S. O., Bjönsson, B. T., Arnesen, A. M., & Stefansson, S. O. (2003). Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains. *Aquaculture*, 220(1), 367-384. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00508-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00508-2)

- Hansen, J. D., & Zapata, A. G. (1998). Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews*, 166(1), 199-220. <https://doi-org.mime.uit.no/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01264.x>
- Haugarvoll, E., Bjerkaas, I., Szabo, N. J., Satoh, M., & Koppang, E. O. (2010). Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. *Vaccine*, 28(31), 4961-4969. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.032>
- Haugland, G. T. (2020). Det medfødte immunsystemet. *Naturen*, 144(5), 164-169. <https://doi.org/10.18261/issn.1504-3118-2020-05-03>
- Hedfers, I. A., Bakke, H., Skjødt, K., & Grimholt, U. (2012). Antibodies recognizing both IgM isotypes in Atlantic salmon. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(5), 1199-1206. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.009>
- Herbert, W. J. (1968). The Mode of Action of Mineral-Oil Emulsion Adjuvants on Antibody Production in Mice. *Immunology*, 14(3), 301-318.
- Hordvik, I. (2020). Det adaptive immunsystemet. *Naturen*, 144(5), 170-176. <https://doi.org/10.18261/issn.1504-3118-2020-05-04>
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe, P., & Turnbull, J. F. (2006). Current issue in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68(2), 332-372. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x>
- Huntingford, F. A., & Kadri, S. (2008). Welfare and Fish. In E. J. Branson (Ed.), *Fish Welfare* (pp. 19-31). Blackwell Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470697610.ch2>
- Ingram, G. A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection - A review. *Journal of Fish Biology*, 16(1), 23-60. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb03685.x>
- Irwin, M. J., & Kaattari, S. L. (1986). Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12(1), 39-45. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(86\)90108-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(86)90108-X)
- Iversen, A., Asche, F., Hermansen, Ø., & Nystøyl, R. (2020). Production cost and competitiveness in major salmon farming countries 2003–2018. *Aquaculture*, 522, 735089. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735089>
- Johansen, L.-H., Dahle, M. K., Wessel, Ø., Timmerhaus, G., Løvoll, M., Røsæg, M., Jørgensen, S. M., Rimstad, E., & Krasnov, A. (2016). Differences in gene expression in Atlantic salmon parr and smolt after challenge with Piscine orthoreovirus (PRV). *Molecular Immunology*, 73, 138-150. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.04.007>
- Jørgensen, J. B. (2014). The Innate Immune Response in Fish. In R. Gudding, A. Lillehaug, & Ø. Evensen (Eds.), *Fish Vaccination* (pp. 85-103). John Wiley & Sons, Incorporated. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch8>
- Kolarevic, J., Stien, L. H., Espmark, Å. M., Izquierdo-Gomez, D., sæther, B.-S., Nilsson, J., Oppedal, F., Wright, D. W., Nielsen, K. V., Gismervik, K., Iversen, M. H., & Noble, C. (2017). Del B. Bruk av operative velferdsindikatorer for ulike oppdretts- og produksjonssystem. In C. Noble, J. Nilsson, L. H. Stien, M. H. Iversen, J. Kolarevic, & K. Gismervik (Eds.), *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*. <http://hdl.handle.net/11250/2477216>
- Koppang, E. O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M. A., Dijkstra, J. M., Köllner, B., Aune, L., Jirillo, E., & Hordvik, I. (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and innovel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, 217(6), 728-739. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01305.x>
- Kryvi, H., & Poppe, T. (2021). *Fiskeanatomi* (2 ed.). Fagbokforlaget.

- Kaattari, S. L., & Irwin, M. J. (1985). Salmonid spleen and anterior kidney harbour populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental and Comparative Immunology*, 9(3), 433-444. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(85\)90006-0](https://doi.org/10.1016/0145-305X(85)90006-0)
- Larsen, J. L., & Pedersen, K. (1999). Del 5: Bakteriesykdommer. In T. Poppe (Ed.), *Fiskehelse og fiskeesykdommer* (pp. 67-125). Universitetsforlaget AS. https://www.nb.no/items/URN:NBN:no-nb_digibok_2008100604012?page=3
- Lieschke, G. J., & Trede, N. S. (2009). Fish immunology. *Current Biology*, 19(16), R678-R682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.068>
- Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., Manzato, F., & Guidi, G. C. (2007). Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 18(5), 525-528. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e3281eec945>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lund, H., Bakke, A. F., Sommerset, I., Afanasyev, S., Schriwer, G., Thorisdottir, A., Boysen, P., & Krasnov, A. (2019). A time-course study of gene expression and antibody repertoire at early time post vaccination of Atlantic salmon. *Molecular Immunology*, 106, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.018>
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. In *Microorganisms* (Vol. 7, pp. 569). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13 ed.). Pearson Education.
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. In *Biobanking: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pp. 289-298). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology* 20(2), 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Magnadóttir, B. (2010). Immunological Control of Fish Diseases. *Marine biotechnology*, 12(4), 361-379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>
- Mainwaring, G., & Rowley, A. F. (1985). The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 80(1), 85-91. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(85\)90683-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(85)90683-8)
- Makesh, M., Megha, K., Bedekar, & Rajendran, K. V. (2022). Overview of Fish Immune System. In M. Makesh & K. V. Rajendran (Eds.), *Fish Immune System and Vaccines* (pp. 1-16). Springer https://doi.org/10.1007/978-981-19-1268-9_1
- Midtlyng, P. J. (1996). A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & shellfish immunology*, 6(8), 553-565. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0052>
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. 6(5), 335-350. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0034>

- Munang'adu, H. M., Mutoloki, S., & Evensen, Ø. (2014). Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 184-196. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.008>
- Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2019). Correlates of protective immunity for fish vaccines. *Fish & shellfish immunology*, 85, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.060>
- Mutoloki, S., Alexandersen, S., & Evensen, Ø. (2004). Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Fish & shellfish immunology*, 16(5), 633-644. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.10.002>
- Mutoloki, S., Brudeseth, B., Reite, O. B., & Evensen, Ø. (2006). The contribution of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to the induction of inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with oil-based vaccines. *Fish & shellfish immunology*, 20(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.005>
- Nielsen, K. V., Patel, S. J., & Sommerset, I. (2023). Vaksineeffekt og bieffekt. *Fiskehelsesrapporten 2022*(Rapport 5a/2023), 172-176. <https://www.vetinst.no/rappporter-og-publikasjoner/rappporter/2023/fiskehelsesrapporten-2022>
- Nilsson, J., & Folkedal, O. (2019). Sampling of Atlantic salmon *Salmo salar* from tanks and sea cages is sizebiased. *Aquaculture*, 502, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.053>
- Nilsson, J., Gismervik, K., Nielsen, K. V., Iversen, M. H., Noble, C., Kolarevic, J., Frotjold, H., Nilsen, K., Wilkinson, E., Klakegg, B., Høge, H. S., Sæther, P. A., Kristiansen, T., & Stien, L. H. (2022). Laksvel - Standardisert operasjonell velferdsovervåking for laks i matfiskanlegg. *Rapport fra havforskningen*. <https://www.hi.no/templates/reporteditor/report-pdf?id=57875&45916154>
- Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kristiansen, T. S., Torgersen, T., Oppedal, F., Folkedal, O., Hvas, M., Gismervik, K., Ellingsen, K., Nielsen, K. V., Mejdell, C. M., Kolarevic, J., Gomez, D. I., Sæther, B.-S., Espmark, Å. M. O., Midling, K. Ø., Roth, B., Turnbull, J. F., & Noble, C. (2017). Del A. fiskevelferd og oppdrettslaks, kunnskap og teoretisk bakgrunn. In C. Noble, J. Nilsson, L. H. Stien, M. H. Iversen, J. Kolarevic, & K. Gismervik (Eds.), *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*. <http://hdl.handle.net/11250/2477217>
- Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Turnbull, J. F., Kristiansen, T. S., Torgersen, T., Oppedal, F., Folkedal, O., Hvas, M., Gismervik, K., Ellingsen, K., Mejdell, C. M., Kolarevic, J., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B.-S., Espmark, Å. M., Midling, K. Ø., & Noble, C. (2020). Velferdsindikatorer for regnbueørret i oppdrett – Del A. Kunnskap og teoretisk bakgrunn. In C. Noble, K. Gismervik, M. H. Iversen, J. Kolarevic, J. Nilsson, L. H. Stien, & J. Turnbull (Eds.), *Velferdsindikatorer for regnbueørret i oppdrett: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd* (pp. 29-82). <https://hdl.handle.net/11250/2654626>
- Noble, C., Kankainen, M., Setälä, J., Berrill, I. K., Ruohonen, K., Damsgård, B., & Toften, H. (2012). The bio-economic costs and benefits of improving productivity and fish welfare in aquaculture: utilizing CO₂ stripping technology in norwegian atlantic salmon smolt production. *Aquaculture Economics & Management*, 16(4), 414-428. <https://doi.org/10.1080/13657305.2012.729251>

- Nordstrand, E. (2021). Immunforsvaret til vaksinert atlantisk laks (*Salmo salar* L.) gjennom en kommersiell produksjonssyklus i sjø. *Masteroppgave, UiT-Norges arktiske universitet, Upublisert*.
- NorgesSjømatråd. (2024). Nøkkeltall. Hentet 23.04.2024. <https://seafood.no/markedsinnsikt/nokkeltall/>
- NRS. (2023). *Besøksrapporter*, Upublisert.
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y., & Skjermo, J. (2012). Verdiskaping basert på produktive hav i 2050. https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri_og_havbruk/publikasjoner/verdiskaping-basert-pa-produktive-hav-i-2050.pdf
- Oppedal, F., Berg, A., Olsen, R. E., Taranger, G. L., & Hansen, T. (2006). Photoperiod in seawater influence seasonal growth and chemical composition in autumn sea-transferred Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given two vaccines. *Aquaculture*, 254(1), 396-410. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.026>
- Oppedal, F., Dempster, T., & Stien, L. H. (2011). Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: A review. *Aquaculture*, 311(1-4), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.020>
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., Gismervik, K., & Stien, L. H. (2019). Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1398-1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12299>
- PHARMAQ. (2020). ALPHA JECT micro 7 ILA. *Veterinærkatalogen, Lastet ned 13.05.24*. <https://www.felleskatalogen.no/medisin-vet/dyreeier/pil-alpha-ject-micro-7-ila-pharmaq-663565>
- Poppe, T. T., & Breck, O. (1997). Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(3), 219-226. <https://doi.org/10.3354/dao029219>
- Poppe, T. T., & Koppang, E. O. (2014). Side-Effects of Vaccination. In R. Gudding, A. Lillehaug, & Ø. Evensen (Eds.), *Fish Vaccination* (pp. 153-161). John Wiley & Sons, Incorporated. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch13>
- Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0181>
- Press, C. M., & Jørgensen, T. Ø. (1999). Del 2: Fiskens immunsystem. In T. Poppe (Ed.), *Fiskehelse og fiske sykdommer* (pp. 37-47). Universitetsforlaget AS. https://www.nb.no/items/URN:NBN:no-nb_digibok_2008100604012?page=3
- Qiagen. (2009). QuantiTect® Reverse Transcription Handbook. <https://www.qiagen.com/at/resources/download.aspx?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en>
- Qiagen. (2021). RNeasy® Mini Kit, Part 1. <https://www.qiagen.com/cn/resources/download.aspx?id=0e32fbb1-c307-4603-ac81-a5e98490ed23&lang=en>
- Qiagen. (2023). RNeasy® Mini Handbook. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f646813a-efbb-4672-9ae3-e665b3045b2b&lang=en>
- Read, N. (2008). Fish Farmer's Perspective of Welfare. In E. J. Branson (Ed.), *Fish Welfare* (pp. 99-110). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470697610.ch7>
- Restifo, N. P., Ying, H., Hwang, L., & Leitner, W. W. (2000). The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Therapy*, 7(2), 89-92. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301117>

- Roberts, R. J. (2012). The Immunology of Teleosts In *Fish Patology* (4 ed., pp. 144-166). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118222942.ch4>
- Roth, B. (2016). Avlusing av laksefisk med Optilice: Effekt på avlusing og fiskevelferd. *Nofima, Rapport 59*. <https://hdl.handle.net/11250/3051299>
- Secombes, C. J., & Belmonte, R. (2016). Overview of the Fish Adaptive Immune System In A. Adams (Ed.), *Fish Vaccines* (Vol. 1, pp. 35-52). Springer Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1>
- Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In *Infectious disease in aquaculture prevention and control* (pp. 3-68).
- Secombes, C. J., Zou, J., Laing, K., Daniels, G. D., & Cunningham, C. (1999). Cytokine genes in fish. *Aquaculture*, 172, 93-102. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00441-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00441-4)
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Evans, J. J., & Arias, C. R. (2009). Use of Modified Live Vaccines in Aquaculture. *Journal of the world aquaculture society*, 40(5), 573-585. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00279.x>
- SjømatNorge. (2023). Beste praksis for god biosikkerhet og bedre sykdomskontroll. *Sjømat 2030*. https://sjomatnorge.no/wp-content/uploads/2023/12/SJOMAT2030_Biosikkerhet-nov2023.pdf
- Sommerset, I. (2023). Sammendrag. *Fiskehelserapporten 2022, Rapport 5a/2023*, 6-11. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2023/fiskehelserapporten-2022>
- Sommerset, I. (2024). Sammendrag. *Fiskehelserapporten 2023, Rapport 8a/2024*, 8-14. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2024/fiskehelserapporten-2023>
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 89-101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Sommerset, I., Nilsen, K., Patel, S., Helgesen, K. O., Udhwani, T., Nielsen, K. V., Moldal, T., Garseth, Å. H., & Skjerdal, T. (2024a). Biosikkerhet. *Fiskehelserapporten 2023, Rapport 8a/2024*(Rapport 8a/2024), 42-52. https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2024/fiskehelserapporten-2023/_attachment/download/1f94e174-ab61-4e71-8bf4-d58e57108321:1b571157652605962504f16f451a5b7041495517/Fiskehelserapporten.pdf
- Sommerset, I., Nilsen, K., Patel, S., Helgesen, K. O., Udhwani, T., Nielsen, K. V., Moldal, T., Garseth, Å. H., & Skjerdal, T. (2024b). Biosikkerhet. *Fiskehelserapporten 2023, Rapport 8a/2024*, 42-52. <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2024/fiskehelserapporten-2023>
- Stien, L. H., Bracke, M., Noble, C., & Kristiansen, T. S. (2020). Assessing Fish Welfare in Aquaculture In T. S. Kristiansen, A. Fernö, M. A. Pavlidis, & H. van de Vis (Eds.), *The Welfare of Fisk* (Vol. 20, pp. 303-321). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41675-1>
- Stien, L. H., Bracke, M. B. M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P. J., Vindas, M. A., Øverli, Ø., & Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5(1), 33-57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01083.x>

- Strandskog, G., Vilhoing, S., Iliev, D. B., Thim, H. L., Christie, K. E., & Jørgensen, J. B. (2011). Formulations combining CpG containing oligonucleotides and poly I:C enhance the magnitude of immune responses and protection against pancreas disease in Atlantic salmon. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(11), 1116-1127. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.016>
- Tafalla, C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1740-1750. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>
- Taranger, G. L., Karlsen, Ø., Bannister, R. J., Glover, K. A., Husa, V., Karlsbakk, E., Kvamme, B. O., Boxaspen, K. K., Bjørn, P. A., Finstad, B., Madhun, A. S., Morton, C. H., & Svåsand, T. (2015). Risk assessment of the environmental impact of Norwegian Atlantic salmon farming. *ICES Journal of Marine Science*, 72(3), 997-1021. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu132>
- Technologies, L. (2014). Real-Time PCR handbook. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>
- Thorarinsson, R., Wolf, J. C., Inami, M., Phillips, L., Jones, G., Macdonald, A. M., Rodriguez, J. F., Sindre, H., Skjerve, E., Rimstad, E., & Evensen, Ø. (2021). Effect of a novel DNA vaccine against pancreas disease caused by salmonid alphavirus subtype 3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Fish and Shellfish Immunology*, 108, 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.12.002>
- Thorpe, J. E., Morgan, R. I. G., Pretswell, D., & Higgins, P. J. (1988). Movement rhythms in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, 33(6), 931-940. <https://doi-org.mime.uit.no/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05542.x>
- Tobar, I., Sergio, A., Torres, C., Vera, V., Soto, P., Carrasco, C., Alvarado, M., Neira, E., Arcos, S., & Tobar, J. A. (2015). Successive oral immunizations against *Piscirickettsia salmonis* and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00244>
- Torres-Corral, Y., Girons, A., González-Barreiro, O., Seoane, R., Riaza, A., & Santos, Y. (2021). Effect of Bivalent Vaccines against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* Subspecie *achromogenes* on Health and Survival of Turbot. *Vaccines*, 9(8), 906. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080906>
- Turnbull, J., Bell, A., Adams, C., Bron, J., & Huntingford, F. (2005). Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture*, 243(1), 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.022>
- Van Muiswinkel, W. B., & Nakao, M. (2014). A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 130-150. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.016>
- Voss, E. W., Groberg, W. J., & Fryer, J. L. (1980). Metabolism of coho salmon Ig: Catabolic rate of coho salmon tetrameric Ig in serum. *Molecular Immunology*, 17(4), 445-452. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(80\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0161-5890(80)90084-X)
- Walde, C. S., Jensen, B. B., Pettersen, J. M., & Stormoen, M. (2021). Estimating cage-level mortality distributions following different delousing treatments of Atlantic salmon (*salmo salar*) in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 44(7), 899-912. <https://doi.org/10.1111/jfd.13348>

- Walde, C. S., Stormoen, M., Pettersen, J. M., Persson, D., Røsæg, M. V., & Jensen, B. B. (2022). How delousing affects the short-term growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Aquaculture*, 561. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738720>
- Walencik, J., & Witeska, M. (2007). The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 331-335. <https://doi-org.mime.uit.no/10.1016/j.cbpc.2007.04.004>
- Wiklund, T., & Dalsgaard, I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(1), 49-69. <https://doi.org/10.3354/dao032049>
- Ye, J., Bromage, E., & Kaattari, S. (2010). The Strength of B Cell Interaction with Antigen Determines the Degree of IgM Polymerization. *The Journal of Immunology*, 184(2), 844-850. <https://doi-org.mime.uit.no/10.4049/jimmunol.0902364>
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B Cell Heterogeneity in the Teleost Kidney: Evidence for a Maturation Gradient from Anterior to Posterior Kidney. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6608-6616. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6608>
- Åkerblå. (2023-2024). *Besøksrapporter*, Upublisert.

7 Vedlegg

Vedlegg 1: Oversikt over reagenser brukt i forsøket.

Vedlegg 2: Oversikt over prøveuttak med dato for hele forsøket.

Vedlegg 3: Oppsett ELISA-plater kjørt med pools og individer.

Vedlegg 4: Gjennomsnittlige Ct verdier og standardavvik for genuttrykket av EF1 α , mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas.

Vedlegg 5: Fold endring (Log2) for genuttrykk mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings.

Vedlegg 6: Resultater for statistiske analyser for Real-Time PCR.

Vedlegg 1 Oversikt over reagenser brukt i forsøket.

Tabell 10 Oversikt over reagenser brukt i forsøket

Reagenser	Produsent/innhold
Benzokain	ACD Pharmaceuticals AS, Norge
Blåning	700 ml vann og 230 microliter ammoniakk. Veterinærinstituttet Harstad, Norge
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
BSA (bovint serumalbumin)	Veterinærinstituttet Harstad, Norge
Carbonated buffer 9,6 pH, SLCC2806	Sigma-Aldrich, USA
DTT (2M dithiothreitol)	Thermo Fisher Scientific, USA
Eosin, 109109	Epredia, USA
Etanol 96%, 23B154010	VWR Chemicals, USA
Etanol absolute, 221084030	VWR Chemicals, USA
Eukitt [®]	Sigma-Aldrich, USA
Fast SYBR [®] Green, 2810022	Thermo Fisher Scientific, USA
Finquel Vet.	Intervet International B.V., Nederland
Formaldehyde solution 37%, K55332202 325	Sigma-Aldrich, USA
Geit anti-mus IgG	Bio Rad, USA
H2SO4 (2M)	Sigma-Aldrich, USA
Hematoxylin, 125448	Epredia, USA
HistoclearTM, 221212-07	Electron Microscopy Sciences
Histocwax	Histolab products AB, Sverige
HyPure™ Molecular Biology Grade Water, AH30016782	Cytiva, USA
ImmPACT [®] Vektor [®] Red Substrate kit, ZK0503	Vector Laboratories, USA
ImmPRESS [®] - AP Hest-anti-kanin IgG, ZK0616	Vector Laboratories, USA
Kanin anti-V.anguillarum O1	Veterinærinstituttet Harstad, Norge
Kanin anti-V.anguillarum O2	Veterinærinstituttet Harstad, Norge
Mus anti-A.salmonicida	Veterinærinstituttet Harstad, Norge
Mus anti-ørret IgM	IgF1-18 (6-1-18) (Hedfors et al., 2012)
Normal Horse Serum 2,5%, ZK0731	Vector Laboratories, USA
PBS (fosfatbufret saltvann)	100 ml PBS 10x + 900 ml MilliQ
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit, 172017774	Qiagen, Tyskland
RNA-later™, 2824601	Thermo Fisher Scientific, USA
Rneasy [®] Mini Kit, 169012188	Qiagen, Tyskland
TBS (trisbufret saltvann)	Stamløsning og 0,9% NaCl. Veterinærinstituttet Harstad, Norge
TMB, 09270221-7	Life Technologies, USA
Tween [®] 20, SLCC6387	Sigma-Aldrich, USA
Tørrmelk, 5U014997	PanReac Applichem, Italia
XyloI	VWR Chemicals, USA

Vedlegg 2 Oversikt over prøveuttak med dato for hele forsøket.

Tabell 11 Oversikt over alle prøveuttak gjennomført med eksakt dato og uker i forhold til vaksinerings.

Prøveuttak	Dato	Uker i forhold til vaksinerings
1	12.08.2022	-1
2	05.11.2022	12
3	05.12.2022	16
4	17.01.2023	22
5	29.03.2023	32
6	24.05.2023	40
7	13.07.2023	47
8	25.09.2023	58
9	28.11.2023	67
10	15.01.2024	74

Vedlegg 3 Oppsett ELISA-plater kjørt med pools og individer.

Tabell 12 Oppsett ELISA-plater med pools. Alle ukene ble kjørt i samme plate i triplikater. V.anguillarum ble fortynnet 1:800 og 1:1600. A.salmonicida ble fortynnet 1:3200 og 1:6400.

		Fortynning A.salmonicida		Fortynning V.anguillarum										
		1:3200	1:6400	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400			
		1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:1600	10	11	12
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
Pools	A	Uke -1	Uke -1	Uke 16	Uke 16	Uke 32	Uke 32	Uke 47	Uke 47	Uke 67	Uke 67			
	B	Uke -1	Uke -1	Uke 16	Uke 16	Uke 32	Uke 32	Uke 47	Uke 47	Uke 67	Uke 67			
Blank	C	Uke -1	Uke -1	Uke 16	Uke 16	Uke 32	Uke 32	Uke 47	Uke 47	Uke 67	Uke 67			
Positiv kontroll	D	Uke 12	Uke 12	Uke 22	Uke 22	Uke 40	Uke 40	Uke 58	Uke 58	Uke 74	Uke 74			
Tom	E	Uke 12	Uke 12	Uke 22	Uke 22	Uke 40	Uke 40	Uke 58	Uke 58	Uke 74	Uke 74			
	F	Uke 12	Uke 12	Uke 22	Uke 22	Uke 40	Uke 40	Uke 58	Uke 58	Uke 74	Uke 74			
	G													
	H													

Tabell 13 Oppsett ELISA-plater med individer. Det ble kjørt en plate for hvert uttak med (n=20) individer i hver plate. Hvert individ ble kjørt i duplikat. V.anguillarum ble fortynnet 1:800 og 1:1600. A.salmonicida ble fortynnet 1:3200 og 1:6400.

		Fortynning A.salmonicida		Fortynning V.anguillarum										
		1:3200	1:6400	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400	1:3200	1:6400			
		1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:1600	10	11	12
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
Individer	A	Fisk 1	Fisk 1	Fisk 5	Fisk 5	Fisk 9	Fisk 9	Fisk 13	Fisk 13	Fisk 17	Fisk 17			
	B	Fisk 1	Fisk 1	Fisk 5	Fisk 5	Fisk 9	Fisk 9	Fisk 13	Fisk 13	Fisk 17	Fisk 17			
Blank	C	Fisk 2	Fisk 2	Fisk 6	Fisk 6	Fisk 10	Fisk 10	Fisk 14	Fisk 14	Fisk 18	Fisk 18			
Positiv kontroll	D	Fisk 2	Fisk 2	Fisk 6	Fisk 6	Fisk 10	Fisk 10	Fisk 14	Fisk 14	Fisk 18	Fisk 18			
	E	Fisk 3	Fisk 3	Fisk 7	Fisk 7	Fisk 11	Fisk 11	Fisk 15	Fisk 15	Fisk 19	Fisk 19			
	F	Fisk 3	Fisk 3	Fisk 7	Fisk 7	Fisk 11	Fisk 11	Fisk 15	Fisk 15	Fisk 19	Fisk 19			
	G	Fisk 4	Fisk 4	Fisk 8	Fisk 8	Fisk 12	Fisk 12	Fisk 16	Fisk 16	Fisk 20	Fisk 20			
	H	Fisk 4	Fisk 4	Fisk 8	Fisk 8	Fisk 12	Fisk 12	Fisk 16	Fisk 16	Fisk 20	Fisk 20			

Vedlegg 4 Gjennomsnittlige Ct verdier og standardavvik for genuttrykket av EF1 α , mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas.

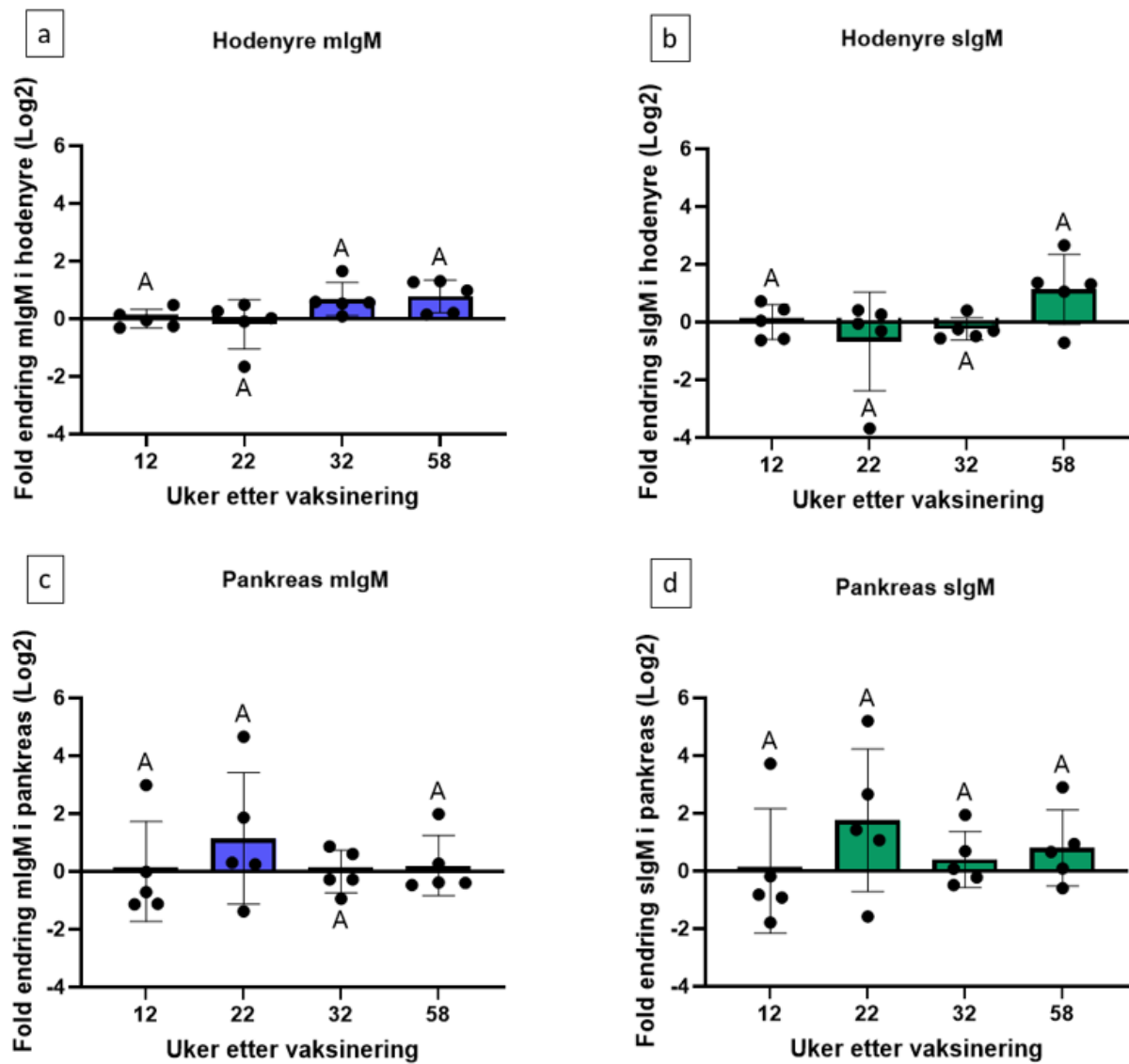
Tabell 14 Gjennomsnittlige Ct verdier og standardavvik for genuttrykket av EF1 α , mIgM og sIgM i hodenyre fra uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5).

	EF1 α		mIgM		sIgM	
	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik
Uke 12	17,14729309	0,037098669	21,68724	0,426656	13,63933	0,208423
	17,98822784	0,161853343	21,79805	0,009837	15,54206	0,008261
	16,98314857	0,016268009	21,31956	0,066785	14,4939	0,047332
	16,95708466	0,018436717	21,55337	0,205785	13,83733	0,104734
	17,36942101	0,120384887	21,51617	0,105838	13,57333	0,237871
Uke 22	19,05	0,081530213	24,99603	0,051731	19,66533	0,045448
	19,0947094	0,046174064	22,8918	0,145143	15,61244	0,104694
	18,36441231	0,010258206	22,38508	0,049099	15,59374	0,133784
	18,01741028	0,063097544	22,28059	0,059246	14,68522	0,219944
	17,68530655	0,045965016	22,06428	0,079902	14,66444	0,109437
Uke 32	18,6710434	0,269143701	22,39331	0,197011	15,8953	0,135223
	18,49840546	0,165761873	22,6992	0,039993	15,98783	0,34316
	18,68035507	0,168606281	22,37778	0,059916	16,09802	0,121499
	19,65352249	0,204385921	22,28898	0,09442	16,17991	0,34151
	18,25769997	0,095398888	22,0108	0,065626	15,42974	0,02266
Uke 58	17,96482468	0,03088521	21,2741	0,060012	13,58337	0,06972
	18,20366096	0,03795509	21,18463	0,093787	12,46692	0,356525
	17,74913597	0,004631433	21,82804	0,127408	13,62534	0,043976
	17,57884979	0,004764954	21,72239	0,006227	15,21961	0,028386
	17,96356583	0,038431183	20,97525	0,08853	13,52934	0,111272

Tabell 15 Gjennomsnittlige Ct verdier og standardavvik for genuttrykket av EF1 α , mlgM og slgM i pankreas fra uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksining. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5).

	EF1 α		mlgM		slgM	
	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik
Uke 12	17,14434052	0,127261907	27,83627	0,022214	19,10557	0,196158
	18,71238708	0,027874915	28,28284	0,144555	20,57528	0,119611
	16,74313545	0,093990847	27,41504	0,001656	19,57519	0,011104
	18,0367775	0,028952524	24,60768	0,152384	15,35775	0,043143
	17,11989212	0,064245284	27,38812	0,168614	18,34961	0,239854
Uke 22	18,61981201	0,035113383	27,92637	0,066387	18,23163	0,156848
	18,96978951	0,026156671	23,86383	0,051206	14,80469	0,087073
	19,46842384	0,571263134	28,71753	0,078163	19,43907	0,380608
	19,95734024	0,877613366	27,64946	0,122775	18,33974	0,443452
	18,98955154	0,014756117	29,92411	0,344798	21,6077	0,062367
Uke 32	19,0987854	0,062986948	28,93131	0,212017	20,0587	0,158716
	20,2095871	0,140685499	29,15598	0,103649	19,30717	0,225904
	19,45926476	0,107369937	29,95775	0,178428	20,72464	0,159575
	20,74256897	0,195024595	29,43681	0,15868	21,09473	0,223773
	19,66095352	0,028100146	29,4951	0,076785	21,19106	0,357555
Uke 58	17,91589737	0,006342932	27,85159	0,159075	18,866	0,196706
	19,13192368	0,040448837	26,69953	0,021185	17,26599	0,082528
	18,72647285	0,132827982	28,75574	0,103834	18,83178	0,141735
	18,43744659	0,340825707	27,72328	0,011303	20,07708	0,188899
	18,33072662	0,015581521	28,27716	0,16585	18,70984	0,229584

Vedlegg 5 Fold endring (Log2) for genuttrykk mIgM og sIgM i hodenyre og pankreas for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings.



Figur 14 Fold endring (Log2) av genuttrykk av EF1 α , mIgM og sIgM i hodenyre (a) og pankreas (b) i uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5). Statistiske forskjeller er vist ved A og B, der ulike bokstaver angir signifikant forskjell og $p < 0,05$.

Vedlegg 6 Resultater for statistiske analyser for Real-Time PCR.

Tabell 16 Statistikk og gjennomsnittlig genuttrykk for mlgM i hodenyre for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble gjort enveis ANOVA og Tukey's multiple comparisons test. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5). Signifikant forskjell er satt til $p < 0,05$.

Tukey's multiple comparisons test	Gjennomsnittlig differanse	95% CI av differanse	Signifikans	Justert p-verdi
12 vs. 22	0,002336	-0,05098 til 0,05565	ns	0,9993
12 vs. 32	-0,03615	-0,08947 til 0,01717	ns	0,2512
12 vs. 58	-0,04114	-0,09446 til 0,01218	ns	0,1634
22 vs. 32	-0,03848	-0,09180 til 0,01483	ns	0,2064
22 vs. 58	-0,04348	-0,09679 til 0,009843	ns	0,1319
32 vs. 58	-0,004991	-0,05831 til 0,04833	ns	0,9930

Tabell 17 Statistikk og gjennomsnittlig genuttrykk for slgM i hodenyre for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble gjort enveis ANOVA og Tukey's multiple comparisons test. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5). Signifikant forskjell er satt til $p < 0,05$.

Tukey's multiple comparisons test	Gjennomsnittlig differanse	95% CI av differanse	Signifikans	Justert p-verdi
12 vs. 22	1,637	-15,38 til 18,65	ns	0,9924
12 vs. 32	1,656	-15,36 til 18,67	ns	0,9922
12 vs. 58	-14,67	-31,68 til 2,349	ns	0,1042
22 vs. 32	0,01906	-17,00 til 17,03	ns	>0,9999
22 vs. 58	-16,3	-33,32 til 0,7126	ns	0,0628
32 vs. 58	-16,32	-33,34 til 0,6936	ns	0,0624

Tabell 18 Statistikk og gjennomsnittlig genuttrykk for mlgM i pankreas for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble gjort enveis ANOVA og Tukey's multiple comparisons test. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5). Signifikant forskjell er satt til $p < 0,05$.

Tukey's multiple comparisons test	Gjennomsnittlig differanse	95% CI av differanse	Signifikans	Justert p-verdi
12 vs. 22	-0,005668	-0,01920 til 0,007866	ns	0,6367
12 vs. 32	0,001307	-0,01223 til 0,01484	ns	0,9923
12 vs. 58	0,0007995	-0,01273 til 0,01433	ns	0,9982
22 vs. 32	0,006975	-0,006558 til 0,02051	ns	0,4745
22 vs. 58	0,006467	-0,007066 til 0,02000	ns	0,5363
32 vs. 58	-0,000508	-0,01404 til 0,01303	ns	0,9995

Tabell 19 Statistikk og gjennomsnittlig genuttrykk for slgM i pankreas for uke 12, 22, 32 og 58 etter vaksinerings. Det ble gjort enveis ANOVA og Tukey's multiple comparisons test. Det ble undersøkt likt antall fisk for alle uker (n=5). Signifikant forskjell er satt til $p < 0,05$.

Tukey's multiple comparisons test	Gjennomsnittlig differanse	95% CI av differanse	Signifikans	Justert p-verdi
12 vs. 22	-3,2	-10,53 til 4,133	ns	0,6067
12 vs. 32	0,7148	-6,618 til 8,047	ns	0,9921
12 vs. 58	0,2641	-7,068 til 7,596	ns	0,9996
22 vs. 32	3,914	-3,418 til 11,25	ns	0,4452
22 vs. 58	3,464	-3,869 til 10,80	ns	0,5455
32 vs. 58	-0,4506	-7,783 til 6,882	ns	0,9980

