

# **Immunresponser hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) etter administrering av forskjellige oljebaserte injeksjonsvaksiner**

-Betydning av adjuvant ved intramuskulær og intraperitoneal injeksjon  
for antistoffrespons og fiskevelferd

**Martin Rønbeck Lundberg**

*Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)*

*Mai 2016*



## Forord

Denne masteroppgaven ble utarbeidet ved Universitetet i Tromsø, Norges arktiske universitet - Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi.

Arbeidet som blir presenter i oppgaven, ble utført ved Norges Fiskerihøgskole (NFH) og Havbruksstasjonen i Tromsø, i perioden oktober 2015 – mai 2016.

Først en stor takk til min hovedveileder, **Tore Seternes**, og min biveileder, **Toni Erkinharju**, for at dere introduserte meg for dette prosjektet. Jeg er heldig som har fått jobbe med et så spennende prosjekt, og en så variert masteroppgave. Takk også til min andre biveileder, **Roy A. Dalmo**, for hjelp og støtte i løpet av prosjektet.

Takk til dere alle for gode og konstruktive samtaler, og for uvurderlige hjelp og veiledning. Det har vært mange fine stunder, med mye latter og gode historier. Kjøreturene ut til Kårvika for prøveuttak, er noe jeg ikke vil glemme.

En stor takk også for alle bidrag fra våre samarbeidspartnere i Vaxxinova, med spesiell takk til **Eivind Isdal**, for hjelp og ekspertise ved vaksinerings og prøveuttak.

Sist, men ikke minst, må jeg få takke mine kjære medstudenter på NFH. Dere har gjort studentlivet til en fantastisk opplevelse, og jeg kommer til å savne dere alle! Spesielt må nevnes, **Ola Brandshaug**, for gode diskusjoner, hjelp, og mye latter i løper av arbeidet med masteroppgaven!



## Sammendrag

Oppdrett av laks (*Salmo salar* L.) har utviklet seg til å bli en stor og viktig næring i Norge. Videre vekst i næringen er i dag først og fremst begrenset av problematikken rundt lakselus (*Lepeophtheirus salmonis* K.), og det er et økt behov for nye ikke-medikamentelle metoder for avlusing av laks i sjø. Bruken av oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) som lusespiser, er en metode som har vist seg svært lovende, og som i økende grad har blitt tatt i bruk i næringen. Høy dødelighet for rognkjeks etter utsett i sjø, forårsaket av bakteriesykdommer som fisken i utgangspunktet er vaksinert mot, indikerer at dagens vaksiner ikke gir tilstrekkelig beskyttelse.

I dette forsøket ble to nye injeksjonsvaksiner for rognkjeks, fra Vaxxinova Norway AS, undersøkt i forhold til immunrespons etter intramuskulær og intraperitoneal administrasjon. Begge vaksinene inneholdt antigen fra *Aeromonas salmonicida* (A-lag type 5 og 6), *Vibrio anguillarum* O1 og *Moritella viscosa*. Den eneste forskjellen mellom vaksinene var adjuvanten, som var basert på enten vegetabilsk- eller mineralolje.

Resultatene viste signifikant lavere vaksinerespons for den vegetabilske olje-adjuvanten, sammenlignet med den mineralolje-baserte adjuvanten. Samtidig ble det vist høy akutt gruppedødelighet etter intramuskulær vaksinering med den mineralolje-baserte vaksinen, sammenlignet med vaksinen basert på vegetabilsk olje. Våre resultater indikerte at vaksiner basert på mineralolje, vil kunne gi økt fare for vesentlig helseskade hos rognkjeks etter intramuskulær injeksjon, eller ved feilstikk i muskel. Slike helseskader ble i langt mindre grad observert ved intramuskulær vaksinering med vegetabilske olje-adjuvanter i vårt forsøk, noe som indikerer at denne typen adjuvanter kan virke mildere på rognkjeks. Resultatene for fiskegrupper med intramuskulær og intraperitoneal vaksinering, ble ikke vist signifikant forskjellige, men variasjonen mellom lav- og høyrespondere ble vist større innad i intraperitonealt vaksinerte fiskegrupper. Lavrespondere i de intramuskulært vaksinerte gruppene viste høyere respons ved ELISA, sammenlignet med lavrespondere i intraperitonealt vaksinerte grupper. Reell beskyttelse av vaksiner og injeksjonsmetoder som ble undersøkt i vårt forsøk, må testes i et senere smitteforsøk, men våre resultater indikerer at intramuskulær vaksinering kan være gunstig for total gruppebeskyttelse etter vaksinering.



## Forkortelser

Gr. 1	fisk med vekt >10 gram ved immunisering
Gr. 2	fisk med vekt mellom 4-8 gram ved immunisering
HC	hele celler
IgM	immunglobulin M
IM	intramuskulær injeksjon
IP	intraperitoneal injeksjon
NK	negativ kontroll
ON	over natten
PBS	fosfatbufret saltvann
PK	positiv kontroll
RT	romtemperatur
SGR	spesifikk vekstrate
US	ultrasonikert
V1	vaksine 1
V2	vaksine 2

# Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING.....	1
1.1 <i>Introduksjon</i> .....	1
2. BAKGRUNN .....	1
2.1 <i>Rensefisk – fra villfangst til oppdrettsfisk</i> .....	1
2.2 <i>Rognkjeks – en effektiv lusespiser</i> .....	3
2.2.1 Biologi og utbredelse .....	3
2.2.2 Rognkjeks som oppdrettsfisk .....	4
2.3 <i>Rognkjeks i oppdrett - dødelighet og dødelighetsårsaker</i> .....	5
2.3.1 Dødelighetsårsaker for rognkjeks og annen rensefisk.....	5
2.3.2 Bakteriesykdommer – dagens problematikk i næringen .....	6
2.4 <i>Immunforsvaret hos beinfisk – et grunnlag for vaksiner</i> .....	7
2.4.1 Immunologiske organer og celler.....	7
2.4.2 Spesifikk, humoral immunitet .....	8
2.5 <i>Vaksiner til fisk – status for dagens oppdrettsnæring</i> .....	9
2.5.1 Vaksiner til oppdrettsfisk – norsk standard .....	9
2.5.2 Vaksiner til rognkjeks i oppdrett .....	10
2.6 <i>Oppgavens problemstilling</i> .....	11
3 MATERIALER OG METODER.....	12
3.1 <i>Vaksiner og dets komponenter</i> .....	12
3.2 <i>Løsninger til prøvetaking og analyser:</i> .....	14
3.3 <i>Forsøksfisk - oppstalling og fôring:</i> .....	16
3.4 <i>Forsøks - og gruppeoppsett:</i> .....	17
3.5 <i>Prøveuttak:</i> .....	20
3.5.1 Organ- og bloduttak.....	20



3.5.2	Bearbeiding og lagring av prøver .....	21
3.6	<b>Analyser</b> .....	22
3.6.1	Registrering av velferdsindikatorer .....	22
3.6.2	ELISA.....	26
3.6.3	Histologi .....	29
3.6.4	Immunhistokjemi .....	32
3.6.5	Mikroskopering og analyser av snitt .....	34
3.6.6	Statistiske analyser og grafiske framstillinger .....	35
4.	<b>RESULTATER</b> .....	36
4.1	<b>Velferdsindikatorer</b> .....	36
4.1.1	Vektøkning etter immunisering.....	36
4.1.2	Scoring av bivirkninger – IP-grupper .....	42
4.1.3	Dødelighet.....	44
4.2	<b>ELISA</b> .....	45
4.2.1	Antistoffrespons – serum-pools .....	46
4.2.2	Antistoffrespons – individserum fra dag 42.....	54
4.3	<b>Immunhistokjemi</b> .....	62
4.4	<b>Histologi</b> .....	65
5.	<b>DISKUSJON</b> .....	69
5.1	<b>Velferdsindikatorer</b> .....	70
5.1.1	Endring i vekst – påvirkning av vaksiner og injeksjonsmetode? .....	70
5.1.2	Scoring av bivirkninger - IP-grupper .....	74
5.1.3	Dødelighet.....	77
5.2	<b>Antistoffrespons</b> .....	80
5.2.1	Antistoffrespons – serum-pools .....	80
5.2.2	Antistoffrespons – individserum fra dag 42.....	84

5.3 <i>Immunhistokjemi</i> .....	87
5.4 <i>Histologi</i> .....	88
5.5 <i>Konklusjoner</i> .....	89
REFERANSER .....	91
APPENDIKS .....	98
<i>Appendiks I</i> .....	99
<i>Appendiks II</i> .....	100
<i>Appendiks III</i> .....	102
<i>Appendiks IV</i> .....	105
<i>Appendiks V</i> .....	109

# 1. Innledning

## 1.1 Introduksjon

Oppdrett av laks (*Salmo salar* L.) har utviklet seg til å bli en stor og viktig næring i Norge. Det ble i 2014 produsert og solgt hele 1,27 millioner tonn laks, til en førstehåndsverdi på 41,1 milliarder norske kroner (1). Innføringen av effektive vaksiner på 1990-tallet, i en periode der bakteriesykdommer utgjorde en effektiv flaskehals for næringens videre vekst, skal ha mye av æren for dette (2). I dag er det påbudt med vaksiner av laks før utsett i sjø (3), og mange bakteriesykdommer er nå i mindre grad problematiske for næringen.

Videre vekst i næringen er i dag først og fremst begrenset av problematikken rundt lakselus (*Lepeophtheirus salmonis* K.), i tillegg til andre utfordringer som rømning og interaksjoner med ville fiskebestander (4). Tradisjonelle avlusningsmetoder, basert på kjemoterapeutisk behandling (5), har i senere tid vist seg å gi redusert effekt. Dette skyldes en gradvis utvikling av resistens mot dagens avlusningsmidler hos lakselus (6, 7). Det er derfor et økt behov for alternative, ikke-medikamentelle avlusningsmetoder. Bruken av rensefisk som lusespiser er en av metodene som har vist seg svært lovende, og som i økende grad har blitt tatt i bruk i næringen.

Villfanget rognkjeks (*Cyclopterus lumpus* L.) og forskjellige arter av leppefisk, har vært mest vanlig å benytte som rensefisk inntil nylig. I løpet av de siste årene har imidlertid bruken av oppdrettet rensefisk, og da særlig rognkjeks, vært økende (8). Rognkjeks er en av de aktuelle artene som har vist seg mest effektiv som lusespiser, og forholder seg i tillegg, i motsetning til mange leppefiskarter, aktiv ved lave sjøtemperaturer (9-11). Dette, pluss andre produksjonsmessige faktorer, har gjort at mange oppdrettere av rensefisk har valgt rognkjeks som oppdrettsart (12, 13)

## 2. Bakgrunn

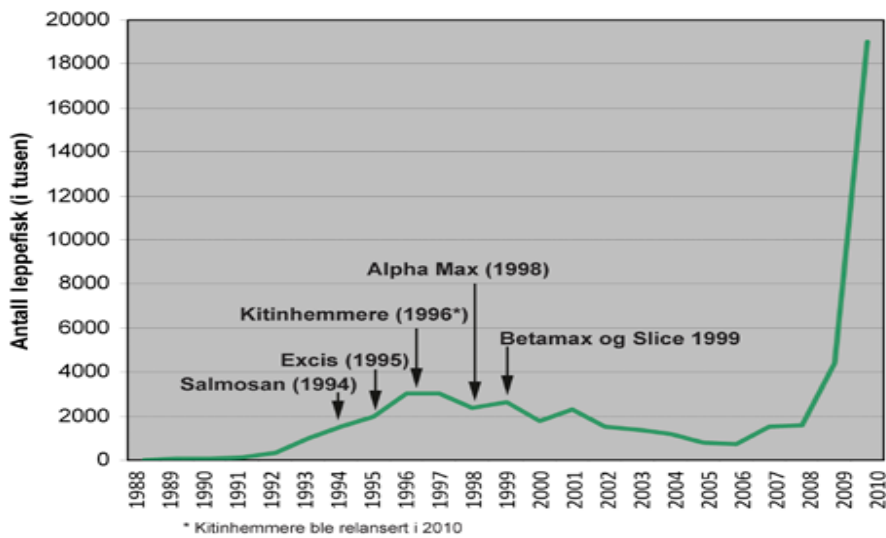
### 2.1 Rensefisk – fra villfangst til oppdrettsfisk

Andre arter av rensefisk som blir brukt i næringen, i tillegg til rognkjeks, er: Bergnebb (*Ctenolabrus rupestris* L.), berggylt (*Labrus bergylta* A.) og grønngylt (*Symphodus melops* L.) (8). Mens rognkjeks er en relativt ny art i oppdrettsnæringen, kan enkelttilfeller med bruk av villfanget leppefisk dokumenteres tilbake til 1970-tallet (14).

Målrettet, kommersiell fangst og bruk av vill leppefisk, begynte å ta form på slutten av 1980-tallet (4). Havforskningsinstituttet gjennomførte flere suksessfulle forsøk med bruk av leppefisk som avlusningsmetode i denne perioden (14, 15). Andre vellykkede forsøk med oppdrett av gressgylt og grønngylt, ble gjennomført av Havforskningsinstituttet i 1994, og de første oppdrettede berggyltene kom i 1997 (16). Dette året var et lokalt toppunkt for bruk av leppefisk i oppdrett, med et forbruk på rundt 3,5 millioner fisk (15).

Innen lakseoppdrett ble det i perioden 1998 til 2000, tatt i bruk flere nye og effektive lusemidler, som Alpha Max, Betamax og Slice. Etterspørselen etter rensefisk gikk følgelig ned, og forbruket holdt seg deretter lavt i flere år (14). Meldinger om redusert effekt av lusemidler, i tillegg til bekymringer rundt resistensutvikling, førte til at etterspørselen igjen tok seg opp etter 2006 (15).

Figur 1 viser forholdet mellom forbruket av rensefisk, og innføringen av forskjellige lusemidler i perioden.



Figur 1. Forbruk av leppesfisk vs. innføringen av forskjellige lusemidler. Kilde: (14)

Figur 1 viser en økning i forbruk av leppesfisk, fra et bunnpunkt i 2006. Tall fra Havforskningsinstituttet har vist en økning fra ca. 1 million leppesfisk (2006), til et forbruk på i overkant av 20 millioner fisk i 2015 (4). Selv om det i dag finnes enkelte anlegg for oppdrett av berggylt, stammer de fleste leppesfiskene fra villfangst.

Et slikt høyt forbruk, og fangst av vill leppesfisk, vil over tid kunne innvirke negativt på lokale populasjoner (15). Fiske og fangst av leppesfisk til bruk i oppdrett foregår i dag over et stort geografisk område. I Norge foregår fiske i hovedsak på Sør- og Vestlandet, og det transporteres i tillegg en del fisk fra Sverige (17). Dette øker faren for å spre sykdom eller parasitter mellom forskjellige, lokale bestander av leppesfisk, i tillegg til annen villfisk eller oppdrettsfisk. I tillegg vil rømning av rensefisk, på samme måte som for oppdrettslaks, kunne gi innvirkninger på genetiske variasjoner i lokale bestander (15, 18).

For å verne om ville bestander, samt redusere faren for vertikal overføring av sykdommer og parasitter, er det ønskelig at videre vekst i bruk av rensefisk skal ha utgangspunkt i oppdrettet fisk (4). Andre fordeler med oppdrett av rensefisk er muligheten til avl for å frembringe mer robuste individer, i tillegg til en jevnere tilgang på rensefisk gjennom året.

I den senere tid har bruk av oppdrettet rensefisk gradvis blitt mer vanlig. Spesielt ser man en økning i produksjon og salg av rognkjeks, som utgjorde ca. 90 % av salget av oppdrettet rensefisk i 2014 (19).

## 2.2 Rognkjeks – en effektiv lusespiser

### 2.2.1 Biologi og utbredelse

Rognkjeks som art i vill tilstand, har en vid utbredelse på begge sider av det nordlige Atlanterhavet, og kan finnes langs hele norskekysten og nordover i Barentshavet (20, 21). Voksen fisk oppholder seg på dypere vann på vinteren, men vandrer inn til grunnere vann på våren for å gyte (4). Eggene legges i store klumper på rundt 50.000 egg, og klekkes etter ca. 300 døgngrader. Larvene er da relativt store (4.5–5 mm) og robuste, med velutviklet sugekopp og en plommesekk som varer i noen få dager (13).

Etter dette spiser yngelen mer eller mindre alt de kommer over, og ligner mer og mer på en voksen fisk. I oppdrett gir dette fordelene av at man kan begynne direkte med startfôring i form av pellets (12, 13). Yngelen utvikler effektive kamuflasjefarger i brunt og grønt, og i vill tilstand skjuler den seg mellom tang og tare før den vandrer ut i havet som kjønnsmoden etter 1-2 år (4).

Voksen rognkjeks er svært opportunistisk, og spiser alt fra børsteormer og små krepsdyr, som lakselus, til småfisk og maneter (20, 21). For at rognkjeks skal utfylle sin funksjon som renseskisk i oppdrett, er det derfor viktig med tilstrekkelig renhold av not og anlegg.

Rognkjeks benytter sugekoppen i buken til å feste seg og hvile på diverse overflater. Gode skjuleplasser er derfor av høy viktighet i oppdrett. Derfra svømmer den hurtig ut, og med høy presisjon, for å plukke mat i vannmassene (13).

Fiskens mange gode egenskaper som oppdrettsfisk, inkludert høy toleranse for lave sjøtemperaturer, gjør den til en meget egnet kandidat som renseskisk ved oppdrett av laks i sjø langs norskekysten (13).

### 2.2.2 Rognkjeks som oppdrettsfisk

Rognkjeks er en relativt ny art i oppdrett. Innledende forsøk, som indikerte god effekt av rognkjeks som rensefisk, ble gjennomført av Gildeskål Forskningsstasjon i 2000 (9). Det var i denne perioden en synkende etterspørsel etter rensefisk, og det gikk mange år før rognkjeks som rensefisk igjen ble et tema.

Et omfattende FHF-prosjekt, som viste lovende resultater for bruk av rognkjeks som lusespiser, ble gjennomført i perioden 2009-2011 (22). Andre forsøk, gjennomført av Imsland et al. i perioden 2011-2012, viste også god effekt av rognkjeks som rensefisk (10, 11).

I løpet av de siste årene har produksjonen av rognkjeks økt kraftig, fra ca. 430.000 fisk i 2012, til i overkant av 3,4 millioner i 2014 (19). Salg av oppdrettet rognkjeks utgjorde ca. 90 % av solgt oppdrettet rensefisk i 2014, mens de resterende 10 % var berggylt. Mens all rognkjeks som benyttes i dag er oppdrettet, stammer det store flertallet av rensefisk i næringen fortsatt fra villfanget leppefisk (4).

Tabell 1 viser utviklingen for salg av oppdrettet rensefisk i perioden 2012 - 2014.

Tabell 1. Salg av oppdrettet rensefisk for bruk til bekjempelse av lakselus. Kilde: (19)

Art	2014		2013		2012	
	Antall 1000 stk.	Verdi 1000 kr	Antall 1000 stk.	Verdi 1000 kr	Antall 1000 stk.	Verdi 1000 kr
Berggylt	379	6 740	95	1 769	270	2 000
Rognkjeks	3 457	52 858	1 954	27 717	431	5 175
Andre arter	0	0	0	0	2	32
<b>Totalt</b>	<b>3 836</b>	<b>59 598</b>	<b>2 049</b>	<b>29 486</b>	<b>703</b>	<b>7 208</b>

## 2.3 Rognkjeks i oppdrett - dødelighet og dødelighetsårsaker

### 2.3.1 Dødelighetsårsaker for rognkjeks og annen rensefisk

Ved utsett av rensefisk i sjø, er det vanlig med en innblanding på mellom 2-10 % i forhold til mengden laks i merdene. Grunnet høyt svinn, må oppdretterne ofte etterfylle med rensefisk i løpet av året (4). Dødelighet opp mot 40 % har blitt rapportert fra næringen (17). Store deler av fisken forsvinner fra merdene i løpet av få uker eller måneder etter utsett i sjø, men den eksakte årsaken til dette er ikke kjent (15).

Det høye svinnet skyldes trolig en kombinasjon av flere faktorer. Rensefisk er sårbar for mekanisk skade, og sår og sårinfeksjoner som oppstår ved transport eller annen håndtering, kan gi dødelig utfall (18). Predasjon, enten via eksterne predatorer som fugl eller direkte via oppdrettslaks, kan også forekomme. I tillegg, hvis maskevidden i nota er for stor, kan små rensefisk rømme fra merden (18). Sykdom, spesielt bakteriesykdommer, er en annen viktig årsak til dødelighet.

Veterinærinstituttet gjennomførte et omfattende forsøk i 2013 (23). I dette forsøket ble 17 sjøanlegg og ett landanlegg overvåket i en periode på seks måneder. Dødelighet og dødelighetsårsaker for rensefisk ble registrert. For forskjellige arter av leppefisk, ble det registrert en samlet dødelighet på mellom 18 og 43 % for de forskjellige artene. Registrert total dødelighet for rognkjeks var på 48 %, med en variasjon mellom enkelt-utsett fra 39 - 100 %. Det ble totalt satt ut 79.350 rognkjeks ved de forskjellige anleggene i forsøket, og dødeligheten tilsvarte dermed i overkant av 38.000 fisk (23).

Dødelighetsårsakene som ble registrert for rognkjeks i det samme forsøket, ble inndelt i fem forskjellige kategorier (gjengitt med %-andel av totalt antall registreringer): 1) gammel/råtten fisk (2 %), 2) liten/avmagret fisk (9 %), 3) sår og finneråte (1 %), 4) andre årsaker (14 %), 5) bakteriell infeksjon (75 %). For kategori 1 var det grunnet høy grad av forråtnelse, vanskelig å definere dødsårsak. Eksakt dødsårsak var også vanskelig å definere for kategori 3 og 4, og det er mulig at flere fisk fra disse kategoriene egentlig ville kunne kommet inn under kategori 5. (23).



### 2.3.2 Bakteriesykdommer – dagens problematikk i næringen

I løpet av forsøket til Veterinærinstituttet i 2013, ble en rekke forskjellige bakterielle agens påvist for rognkjeks (23). Atypisk *Aeromonas salmonicida* (atypisk furunkulose), *Pasteurella sp.* (pasteurellose), *Vibrio anguillarum* (vibriose) og *Tenacibaculum sp.* (sår og sårinfeksjoner), ble regnet som de viktigste patogene (sykdomsfremkallende) artene. Disse sykdommene er aktuelle også i dagens sykdomsbilde for rognkjeks (8).

I løpet av høst/sensommer 2015, ble det rapportert inn en rekke tilfeller av forhøyet dødelighet for rognkjeks i perioden rett etter utsett i sjø (24). Veterinærinstituttet gjennomførte en omfattende undersøkelse for å kartlegge mulige årsaker til denne forhøyede dødeligheten. Forsøket ble gjennomført som en retrospektiv (tilbakeskuende) undersøkelse, basert på resultater fra innsendte diagnostiske prøver fra rognkjeks i perioden 1. januar – 30. november 2015, i tillegg til tilbakemeldinger fra aktuelle fiskehelsetjenester rundt sykdomsutbrudd og innsendelser av prøver.

Av totalt 188 behandlede saker med rognkjeksmateriale i undersøkelsen, ble bakterielle agens påvist for 151 tilfeller (24). Dette tilsvarer 80 % av innsendt materiale i perioden. Atypisk furunkulose ble ansett som den viktigste årsaken til dødelighet for sjøsatt rognkjeks i 2015, med 54 påviste tilfeller i undersøkelsen. Dette tilsvarer 35 % av bakterielle påvisninger i undersøkelsen.

Vibriose forårsaket av *Vibrio anguillarum* ble påvist i 17 tilfeller, mens vibriose forårsaket av *Vibrio ordalii* ble påvist i 5 tilfeller (24). Samlet tilsvarer vibriose 14 % av de bakterielle påvisningene i undersøkelsen. Bakterielle sår og bakteriell sepsis (blodforgiftning), med uspesifiserte agens, ble påvist ved henholdsvis 21 og 10 tilfeller. De resterende bakterielle påvisningene stammet fra andre bakteriearter, eller blandingsflora av disse.

Over 60 % av sjøsatt rognkjeks fra anlegg i undersøkelsen ble vaksinert, enten via stikk- eller dyppvaksine, eller en kombinasjon av disse. Rapporten konkluderte blant annet med at dagens vaksiner for rognkjeks ikke er effektive nok. Mange av fiskehelsetjenestene som ble intervjuet i undersøkelsen, uttrykte et ønske om bedre vaksiner for rensefisk, spesielt mot atypisk furunkulose (24).

## 2.4 Immunforsvaret hos beinfisk – et grunnlag for vaksinerings

### 2.4.1 Immunologiske organer og celler

Det immunologiske systemet en finner hos høyerestående vertebrater, utgjør et velutviklet forsvarssystem mot eksterne patogener. Immunforsvaret består av en rekke celler, molekyler og spesialiserte vev og organer, og inndeles normalt i to deler: det medfødte (uspesifikke) og det adaptive (spesifikke) immunforsvaret (25).

Den mest fremtredende forskjellen mellom immunforsvaret til beinfisk, og det som finnes hos høyerestående vertebrater, er at beinfisk ikke har utviklet et system med beinmarg og lymfeknuter. Funksjonene til disse organene oppfylles i stedet av hode- og baknyre, thymus, milt og lymfoid vev i tarm og gjeller (26).

Hodenyren innehar mange av de samme egenskapene som beinmarg hos pattedyr, og er, i tillegg til thymus, et av de primære lymfoide organene hos beinfisk (27). Primære lymfoide organer er organer der det dannes og modnes leukocytter. Leukocytter hos beinfisk kan inndeles, rent morfologisk, i granulocytter, monocytter/makrofager og lymfocytter (T- og B-lymfocytter, samt naturlige drepeceller)(26, 28).

Mens granulocytter, monocytter og NK-celler (fra engelsk: *natural killer cells*) spiller viktige roller i det medfødte immunforsvaret, danner T- og B-lymfocytene, eller T- og B-cellene, grunnlaget for det adaptive immunforsvaret (28). Cellene modnes i thymus (T-celler) og i hodenyren (B-celler). Modne B-celler vandrer fra hodenyren, videre mot baknyren og milt, som fungerer som sekundære lymfoide organer (29). T- og B-celler aktiveres ved binding av fremmede antigener til MHC-komplekser (fra engelsk: *major histocompatibility complex*) i celleoverflaten, eller via binding av frie- og/eller membranbundne immunglobuliner (Ig). (28)

### 2.4.2 *Spesifikk, humoral immunitet*

Immunglobuliner (Ig), eller antistoffer, danner et viktig grunnlag for humoral immunitet. Spesifikk, humoral immunitet, eller antistoff-mediert immunitet, er den delen av det adaptive immunforsvaret som aktiveres ved infeksjon av ekstracellulære mikrober og toksiner (25).

Til nå har tre klasser av immunglobuliner blitt identifisert hos beinfisk: IgM, IgT og IgD (30). Av disse, dominerer IgM i det systemiske kretsløpet (blodsystemet), og spiller en viktig rolle for humoral immunitet hos beinfisk. Modne B-celler, som har utviklet seg til plasmaceller eller plasmablaste, aktiveres ved binding av fremmede antigener ved førstegangs eksponering, også kalt primær immunrespons. Dette starter produksjon av antigen-spesifikke IgM-strukturer, som bindes i cellemembranen eller sirkulerer fritt i blodomløpet (29-31). IgM, membranbundet eller fritt sirkulerende, innehar evnen til å gjenkjenne antigener ved sekundær eksponering, noe som kan føre til en hurtigere og kraftigere sekundær immunrespons.

Siden lite forskning har blitt gjennomført for rognkjeks, er kunnskapen om artens immunologi meget begrenset. Et økende forbruk av rognkjeks som renseskjeks, samt tidligere nevnte problemer med bakterielle sykdommer i næringen, har imidlertid i de senere år ført til en økning i forskning rundt dette temaet.

Leukocytter ble for første gang forsøkt karakterisert hos rognkjeks i 2012. En rekke forskjellige leukocytter ble identifisert, og fagocytterende celler ble påvist (32). Dette indikerer at det medfødte immunforsvaret er velfungerende hos rognkjeks. Videre, ble IgM og B-celler påvist hos rognkjeks i 2015 (33). I det samme forsøket ble spesifikk antigen-respons påvist via immunisering. Dette viser at rognkjeks innehar de immunologiske funksjoner som kreves for adaptiv immunrespons, noe som danner grunnlag for effektiv vaksinerings av rognkjeks i oppdrett.

## 2.5 Vaksiner til fisk – status for dagens oppdrettsnæring

### 2.5.1 Vaksiner til oppdrettsfisk – norsk standard

Utvikling og bruk av vaksiner for å forebygge infeksjose sykdommer hos laks i oppdrett, har vært en viktig faktor for næringens vekst (2). I dag er det påbudt med vaksiner av all oppdrettslaks, mot enkelte bakteriesykdommer før utsett i sjø (3). Slike pålegg finnes ikke for rognkjeks eller annen rensefisk.

Den mest vanlige vaksineringsmetodene i Norge i dag, er multivalente stikkvaksiner som injiseres i bukhulen (34). Multivalente vaksiner, eller flerkomponent-vaksiner, er vaksiner basert på to eller flere agens. Denne formen for vaksiner har vist god effekt mot en rekke bakteriesykdommer i Norge (34, 35). Agenset i vaksinen består som oftest av inaktiverte eller isolerte deler av bakterieceller, som suspenderes i vann. For å gi økt effekt, blir agenset blandet (emulgert) inn i en olje-adjuvant. Det kan brukes forskjellige typer av adjuvanter, men det mest vanlige i Norge er vann-i-olje emulsjoner (34).

Det er agenset i vaksinen som aktiverer den immunologiske responsen hos fisken, mens adjuvanten forsterker effekten, og holder agenset samlet og sikrer jevn distribuering i verten over tid (36). Innføringen av oljebaserte vaksiner på 1990-tallet gjorde at næringen overkom datidens problemer med dødelighet knyttet til furunkulose. Det viste seg samtidig at oljebaserte vaksiner forårsaker omfattende bivirkninger ved injeksjon i bukhulen (37). Sammenvoksinger og andre vaksinasjonsskader er i dag knyttet til injeksjon av olje-baserte vaksiner i bukhulen hos laks, og små til moderate lesjoner er ansett som akseptable (38).

Man skiller mellom ordinære, kommersielle vaksiner, og autogene vaksiner (39). Autogene vaksiner er definert av Statens Legemiddelverk: «*Et immunologisk legemiddel til dyr, fremstilt fra patogene organismer og antigener isolert fra et dyr eller en besetning og anvendt til behandling av dette dyr eller denne besetning på samme sted*» Videre står det for vaksiner til fisk: «*Det kan eventuelt aksepteres at samme isolat benyttes til fremstilling av vaksine til fisk som skal settes ut på flere lokaliteter i samme fjordområde som har felles smittekilde/identisk patogen agens*» (40).

### 2.5.2 Vaksiner til rognkjeks i oppdrett

Ett av de viktigste argumentene for vaksiner, i tillegg til individuell beskyttelse, er oppnåelsen av flokk-immunitet (fra engelsk: *herd immunity*). Denne effekten oppstår når et gitt, høyt antall individer i en populasjon har utviklet immunitet mot gitte sykdommer, noe som resulterer i et lavere smittepress for ikke-beskyttede individer (35, 41).

Det råder i dag bekymringer for om infeksjøs sykdommer hos rognkjeks og annen rensefisk kan smitte over på laks, og/eller om sykdommer hos oppdrettslaks kan smitte over til rensefisk (18, 39). For å opprettholde effekten av flokk-immunitet i norsk oppdrettsnæring, er det viktig å utvikle effektive vaksiner for alle arter i oppdrett. Dagens sykdomsbilde for rognkjeks og annen rensefisk, indikerer at dette ikke er oppnådd med de vaksinene som benyttes i næringen i dag (23, 24).

Det foregår nå omfattende forskning innenfor temaet rensefisk. Nye vaksiner til leppefisk og rognkjeks blir testet ut. I følge en rapport fra Nofima fra februar 2016 (39), finnes det i dag, i tillegg til vaksinene som er blitt testet i dette forsøket, kun en kommersiell stikkvaksine for rognkjeks i Norge. Dette er ALPHA MARINE<sup>®</sup> micro 4 fra PHARMAQ AS (39).

I følge pakningsvedlegget, publisert på nettsidene til PHARMAQ AS (42), inneholdt vaksinen formaldehydinaktiverte kulturer av atypisk *Aeromonas salmonicida* (A-lag type ikke spesifisert), samt *Listonella anguillarum* serotype O1, O2a og O2b. Adjuvanten var flytende parafinolje (mineralolje), og vaksinen var produsert som en vann-i-olje emulsjon.

Denne vaksinen ble imidlertid trukket tilbake i 2015, og ble erstattet med stikkvaksinen AMARINE<sup>®</sup> micro 4-2 i 2016 (pers. med. Øyvind Vågnes, Vaxxinoa Norway AS, april 2016). I følge pakningsvedlegget, publisert på nettsidene til PHARMAQ AS (43), inneholder vaksinen formaldehydinaktiverte kulturer av atypisk *Aeromonas salmonicida* (A-lag type 3 og 6), samt *Listonella anguillarum* serotype O1 og O2a. Adjuvanten er flytende parafinolje (mineralolje), som en vann-i-olje emulsjon.

## 2.6 Oppgavens problemstilling

Med innføringen av nye arter i oppdrett, møter man ofte nye utfordringer (44). Høy dødelighet, og redusert velferd for rognkjeks og annen fisk i oppdrett, er et problem som stadig tas opp til debatt (45, 46). For rognkjeks og annen rensefisk opplever man i dag et høyt svinn i sjøfasen, og dødelighet opp mot 40 % har blitt rapportert fra næringen (17). Bakteriesykdommer er ansett som en sentral årsak til den høye dødeligheten (23, 24). I likhet med flere andre oppdrettsarter, er bakterieinfeksjoner viktige årsaker til svinn (47), og det er i dag et behov for å utvikle nye og mer effektive vaksiner spesifikt tilpasset for rognkjeks (39).

Med bakgrunn i dette, var det interessant å undersøke immunrespons hos rognkjeks etter intramuskulær og intraperitoneal administrasjon av to ulike oljebaserte injeksjonsvaksiner. Som adjuvant ble det i vaksine 1 brukt vegetabilsk olje, og i vaksine 2 ble det brukt en mineralolje. Følgende fire antigener ble inkludert i begge vaksinene: *Aeromonas salmonicida* gruppe 5 og 6, *Vibrio anguillarum* O1 og *Moritella viscosa*.

### Delmål

1. Undersøke velferdsindikatorer som tilvekst, bivirkninger i hht. Speilberg skala og dødelighet etter intramuskulær og intraperitoneal injeksjon av de to forskjellige vaksinene.
2. Undersøke utvikling av, og eventuelle forskjeller i antistoffrespons etter intramuskulær og intraperitoneal injeksjon med de to forskjellige vaksinene.
3. Utføre histologiske undersøkelser for å studere distribusjon av antigen, samt grad av betennelse etter intramuskulær injeksjon av de to forskjellige vaksinene.

## 3 Materialer og Metoder

### 3.1 Vaksiner og dets komponenter

Begge vaksiner som ble benyttet i dette forsøket, var testvaksiner fra Vaxxinova Norway AS. Følgende fire antigener ble inkludert i begge vaksiner: *Aeromonas salmonicida* gruppe 5 og 6, *Vibrio anguillarum* O1 og *Moritella viscosa*. Den eneste forskjellen mellom vaksiner, var at det ble benyttet forskjellige olje-adjuvanter, fordelt på følgende måte mellom de to vaksiner:

***Vaksine 1: basert på adjuvant av vegetabilsk olje (ikke oppgitt)***

***Vaksine 2: basert på adjuvant av mineralolje (parafin)***

Av konkurransemessig hensyn, er detaljene rundt adjuvanter og spesifikke bakterie-isolater holdt tilbake av produsent. Annen produksjonsmessig informasjon, formidlet fra Vaxxinova, står oppført under:

Isolatene ble først blandet ut manuelt i PBS med 1.5 % NaCl til ønsket styrke. Videre blanding foregikk i en IKA T18 Ultraturrax homogenisator.

Følgende blandingsprosedyre ble benyttet ved utblanding av vaksine 1 (vegetabilsk olje):

1. Olje og surfactant blandes i 1 min ved 10.000 rpm
2. Antigen (i PBS) blandes 1 min ved 10.000 rpm
3. Tilsetter vannfase sakte til oljen, som blandes ved 10.000 rpm til homogenitet oppnås
4. Videre blanding ved 20.000 rpm i 1 minutt

Følgende blandingsprosedyre ble benyttet for vaksine 2 (mineralolje):

1. Antigen og en blanding av vann og Tween 80 (60 % vann / 40 % Tween 80) ble blandet ut ved 10.000 rpm i 4 x 5 sekunder
2. Miksen fra punkt 1. blandes med parafinolje ved 10.000 rpm i 3 minutter

Blandingsforholdet i de forskjellige vaksinene var 70 % olje og 30 % vann.

Antigenene som ble benyttet i vaksinene, har tidligere blitt påvist ved sykdomsutbrudd hos rognkjeks (8, 23, 24).

De forskjellige gruppene (A-lag typene) av *A. salmonicida*, ble nylig klassifisert av Gulla et al. (48). Atypiske varianter av *A. salmonicida*, gruppe 5 og 6, ble også påvist hos rognkjeks etter utsett i sjø av Gulla et al. (49).

Vaksinene som ble benyttet i dette forsøket, inneholdt dermed antigener som er høyst aktuelle for det nåværende sykdomsbildet for rognkjeks og annen rensefisk.



### 3.2 Løsninger til prøvetaking og analyser:

Her følger en oversikt over de viktigste løsninger, reagenser og forkortelser benyttet i forsøket. En fullstendig liste over reagenser og produsenter finnes i appendiks I.

**Tabell 2. Løsninger for prøvetaking og immunisering.**

---

Desinfisert vann (dH<sub>2</sub>O):

Tappes fra Milli-Q® Direct Water Purification System på NFH

Formalin:

900 ml dH<sub>2</sub>O

100 ml formaldehyd (> 34,5 %)

Fosfatbufret saltvann (PBS):

900 ml dH<sub>2</sub>O

100 ml 10x PBS fra NFH

---

**Tabell 3. Løsninger for immunhistokjemi.**

---

Tris-bufret saltvann (TBS):

900 ml dH<sub>2</sub>O

100 ml 10x TBS fra NFH

TBS med 0,1 % Tween (TBST):

1000 ml TBS

1 ml Tween 20

Blokkerings-buffer:

100 ml TBS

30 g fettfri tørrmelk

0,3 ml Tween 20

500 IU Na-heparin pr. ml ferdig løsning

Substrat-løsning:

dH<sub>2</sub>O

SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets (1 pr. ml dH<sub>2</sub>O)

---

**Tabell 4. Løsninger for ELISA.**

---

PBS med 0,05 % Tween (PBST):

1000 ml PBS

0,5 ml Tween 20

Coating-buffer (pH 9,6):

0,795 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

1,465 g NaHCO<sub>3</sub>

500 ml dH<sub>2</sub>O, og tilpassing av pH til 9,6 med HCL

Pre-coatingbuffer:

0,5 ml 0,1 % Poly-L-lysin løsning (PLL)

99,5 ml coating-buffer

Blokkerings-buffer:

2,5 g fettfri tørrmelk

50 ml PBST

Analyse-buffer:

0,5 g fettfri tørrmelk

100 ml PBST

Substrat-buffer:

7,51 g glysin

203 mg MgCl<sub>2</sub>

136 mg ZnCl<sub>2</sub>

1000 ml dH<sub>2</sub>O, og tilpassing av pH til 10,4 med NaOH

Substrat-løsning:

Substrat-buffer

Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) tabletter (1 pr. 5 ml Substrat-buffer)

---

### 3.3 Forsøksfisk - oppstalling og fôring:

Fisken som ble benyttet i forsøket var rognkjeks som stammer fra villfanget avlsfisk som holdes hos Norsk oppdrettsservice AS i Flekkefjord. Derfra ble rogn levert til Nofima AS sitt landanlegg på Kraknes, som til daglig driftes av Havbruksstasjonen i Tromsø AS. Klekkingen foregikk i perioden 1-3. juni 2015, hvorpå yngelen ble levert fortløpende til Havbruksstasjonen sitt landanlegg i Kårvika.

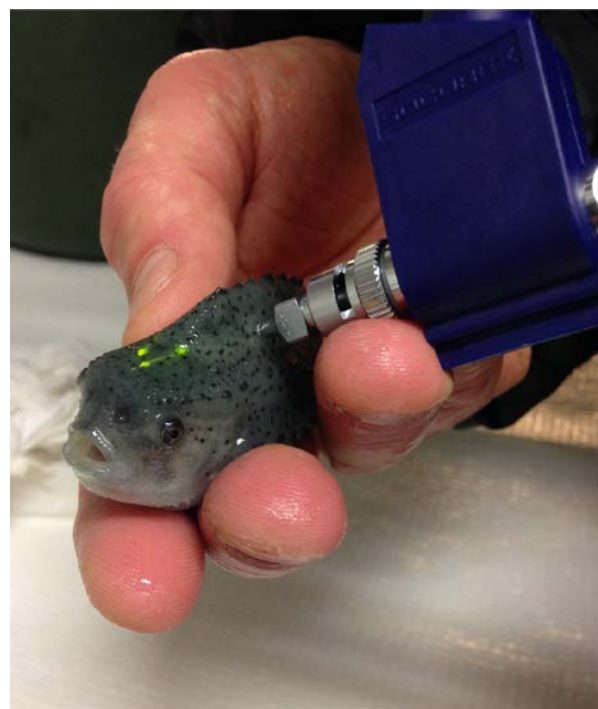
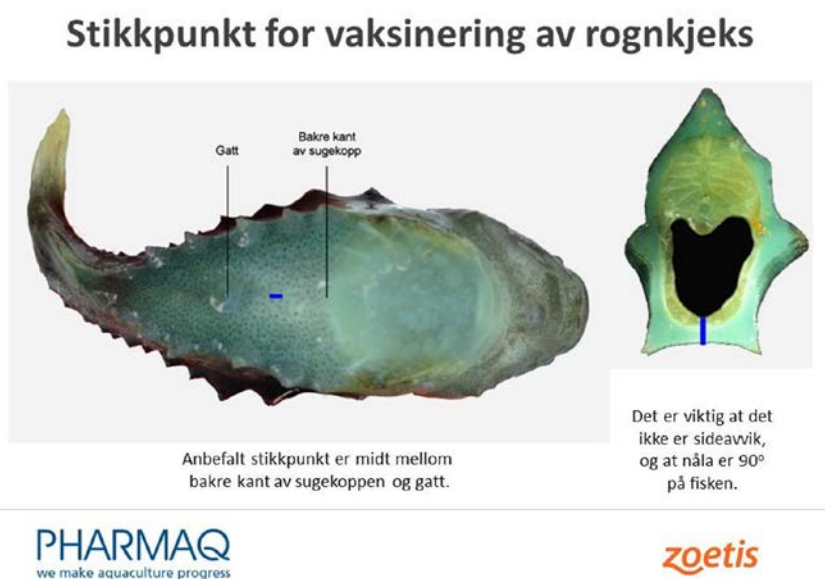
Etter oppstalling ble fisken gitt start-fôr tilpasset marin yngel i en periode inne på avdelingene D og E, før sortering inn i grupper etter størrelse i karene A14, A15 og A20 på avdeling A. I startfôrings-fasen ble det gitt forskjellige typer fôr: Fisken som ble sortert inn i kar A14, fikk fôr fra Tromsø Fiskeindustri AS (Aglonorse), mens fisken i A15 og A20, fikk en blanding av fôr fra BioMar AS (ProWean og ProStart). Dette er den eneste registrerte forskjellen i behandling før forsøksstart. Etter at fisken ble overført til avdeling A, ble den gitt vekst-fôr fra Skretting AS (Amber Neptun) etter appetitt (*ad libitum*) gjennom hele forsøket. Fisken ble sultet de siste 48 timene før forsøksstart, for å redusere faren for tarmstikk ved immunisering.

Fire dager før, og opp til forsøksstart, ble temperaturen gradvis økt i karene for å akklimatisere fisken til ønsket temperatur på 10 °C (fra naturlig sjøtemperatur på ca. 9 °C). På dag 0 ble fisken overført til nye, sirkulære kar på 140 L med oppvarmet sjøvann (10 °C) inne på avdeling A, og denne temperaturen ble holdt gjennom hele forsøket ( $\pm 1$  °C). Temperatur, fôr-spill og fiskens oppførsel i karene ble kontrollert daglig. O<sub>2</sub>-metningen (som skulle ligge på rundt 100 %) ble kontrollert ukentlig.

### 3.4 Forsøks - og gruppeoppsett:

Selve forsøket ble inndelt i to deler, med immunisering av henholdsvis fiskegruppe 1 (Gr. 1) og fiskegruppe 2 (Gr. 2) med en ukes mellomrom (19.10.15 og 27.10.15). Inndelingen av de to gruppene ble gjort etter fiskestørrelse i forkant av immunisering; fisk over 10 gram til Gr. 1, og fisk mellom 4-8 gram til Gr. 2. Det ble akseptert en feilmargin på  $\pm 0,5$  gram i forhold til øvre og nedre vekt-grenser (med unntak av nedre grense for Gr. 2, som var på 4,0 gram). Dette ble gjort for å få nok fisk til å fylle de forskjellige gruppene.

Deretter ble fisken delt videre inn i to hovedgrupper ut fra injeksjonsmetode; enten via intramuskulær (IM) eller intraperitoneal (IP) injeksjon. Injeksjonsmetoder og stikksted er illustrert i figur 2.



**Figur 2. Injeksjonsmetoder for rognkjeks.**

IP injeksjon (tv.) - stikkstedt midt mellom gattåpning og bakre kant av sugekopp. Kilde: (50)

IM injeksjon (th.) - dorsalt stikkstedt, på venstre side av ryggpukkel og vertikalt for brystfinnen.

Foto (IM-bilde th.): Martin Rønbeck Lundberg

Hovedgruppene ble videre inndelt i tre undergrupper etter hvilke injeksjonsløsninger fisken ble administrert; enten vaksine 1 (V1), vaksine 2 (V2) eller PBS. Hver av IM-gruppene besto av totalt 62 fisk, mens IP-gruppene besto av totalt 25 fisk. I tillegg ble det medregnet tre kontrollgrupper (ikke-immunisert negativ kontroll) bestående av 5 fisk. Av velferdsmessige årsaker, og på bakgrunn av anbefalinger fra produsent (Vaxxinoa Norway AS), ble ikke V2 administrert IM til fisk i Gr. 2. Dette gir et totalt antall på 475 fisk i forsøket. Gruppeinndelingene er illustrert i tabell 5.

Tabell 5. Gruppeinndeling og oppstalling

Gruppe	Injeksjon	Kar nr.	Adm.	Ant. fisk
<b>Gr. 1</b> (> 10 g)	<b>IM</b>	A17	V1	62
			V2	62
			PBS	62
	<b>IP</b>	A18	V1	25
			V2	25
			PBS	25
	-	A15 og A20	Kontroll	10
<b>Gr. 2</b> (4-8 g)	<b>IM</b>	A11	V1	62
			V2	-
			PBS	62
	<b>IP</b>	A12	V1	25
			V2	25
			PBS	25
	-	A14	Kontroll	5
Total sum av ant. fisk i forsøket				475

Ved forsøksstart ble fisken overført til et ventekar. Deretter ble fisken gradvis håvet over til et bedøvelseskar, og bedøvet (med innsovningstid på 30-50 sekunder) med ett gram Finquel vet. (Western Chemical Inc., USA) fordelt på ti liter sjøvann, før videre håndtering.

Hver enkelt fisk ble deretter undersøkt og veid. Enkeltfisk som ikke tilfredsstilte øvre og nedre vektkrav, eller hadde fysiske deformiteter etc., ble sortert ut og ikke tatt med i forsøket. Fisken ble så fordelt slik det står oppført i tabell 5. Bedøvelse av rognkjeks før vaksinerer er ingen fast standard (50), men ble vurdert gunstig for dette forsøket grunnet ekstra håndtering ved merking etc.

Deretter ble fisken merket ved hjelp av VIE-merking (Visible Implant Fluorescent Elastomer), i overgangen mellom hodet og fremre del av ryggpukkel. Merkemethoden er vurdert som egnet av Nofima (51) og Veterinærinstituttet (52), og ble gjennomført i henhold til manualer fra produsent (53). V1-gruppene ble merket med rødt, V2-gruppene med gult (grønt fluoriserende) og PBS-gruppene med oransje (gul-oransje fluoriserende). Disse fargene kunne enkelt skilles fra hverandre ved håndtering og etter overføring til kar, ved å benytte blå LED-lykt for å synliggjøre fluoriseringen. Det ble benyttet LED-lykt, elastomer-farger og injeksjonssett fra Northwest Marine Technology Inc., USA.

Etter merking fikk hver fisk injisert en dose på 50 µl av enten V1, V2 eller PBS, før direkte overføring til oppvåkningskar. Selve immuniseringen ble gjennomført av personell fra Vaxxinova Norway AS. Det ble benyttet en Microfish 0,05 ml selvpåfyllende doseringsprøyte (Kaycee Veterinary products LTD, UK) og nåler fra Unimed på 0,5 x 3 mm for Gr. 2, og 0,5 x 4 mm for Gr. 1 (Unimed SA, Sveits). Etter oppvåkning ble fisken overført direkte til forsøkskarene (IP-grupper og IM-grupper fordelt på to adskilte kar), med unntak av IM-fisk som skulle tas ut for prøvetaking etter en og fire timer. Disse ble vaksinert til slutt og overført til egne kar på 50 liter etter oppvåkning, hvor de befant seg frem til uttakstidspunktet. Dette er illustrert i figur 3.



**Figur 3. Kar for fisk som skulle tas ut etter 1 og 4 timer.**

Foto: Martin Rønbeck Lundberg

### 3.5 Prøveuttak:

#### 3.5.1 Organ- og bloduttak

Det ble videre gjennomført uttak av blod- og organprøver ved gitte intervaller etter immunisering (se tabell 6). I sammenheng med prøveuttak ble det, i henhold til metoder oppgitt i delkapittel 3.6.1 b, i tillegg gjennomført visuelle undersøkelser av bukorganer hos fisk i IP-grupper på dag 21, 42 og 84.

**Tabell 6. Forsøksoppsett og uttaksplan for samtlige fiskegrupper.**

21 og 42 dager\*: Uttak av IM-grupper: 6 fisk (Speilberg + blod) + 4 fisk (prøvetaking + blod).

21 og 42 dager\*: Uttak av IP-gruppen: 10 fisk (Speilberg + blod).

84 dager \*\*: Uttak av resterende fisk fra samtlige grupper (Speilberg + blod).

Kontroll \*\*\*: Uttak av blodprøver fra uvaksinert kontrollfisk (kar A20) på dag 84.

Gruppe 1							Gruppe 2						
(> 10 g)							(4-8 g)						
Tidspunkt	IM			IP			IM			IP			Sum
	V1	V2	PBS	V1	V2	PBS	V1	V2	PBS	V1	V2	PBS	
Dag 0	5			-	-	-	5			-	-	-	10
1 time	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
4 timer	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
1 dag	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
2 dager	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
4 dager	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
7 dager	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
14 dager	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
21 dager *	10	10	10	10	10	10	10	-	10	10	10	10	110
28 dager	4	4	4	-	-	-	4	-	4	-	-	-	20
42 dager *	10	10	10	10	10	10	10	-	10	10	10	10	110
84 dager **	10	10	10	5	5	5	10	-	10	5	5	5	80
Kontroll ***	5												5
Sum	191			75			129			75			475

På bakgrunn av egne forsøk med bedøving av rognkjeks, samt artikler og rapporter som tar for seg dette temaet (50, 54), ble det besluttet å ikke benytte bedøvelse til eller i forkant av avliving. Rognkjeks er ansett som en rolig fisk ved håndtering, og bedøvelse har blitt vist å kunne gi økt stress for rognkjeks ved transport og håndtering (54).

Fisken ble håvet opp av karene og overført til et ventekar, før en og en fisk ble tatt opp og påført et slag mot hodet. Etter veiing og måling ble dette etterfulgt av dekapitering, før videre prøvetaking. Denne metoden samsvarer med gjeldende lovverk (3, 55), samt kultiveringsveilederen fra Veterinærinstituttet (56), og ble gjort med mål om å utsette fisken for minst mulig fysisk og mental lidelse.

For IM-grupper ble det tatt ut prøver på formalin fra stikksted, hodenyre, milt og gjeller, samt prøver av stikksted, hodenyre og milt på RNAlater® (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). For IP-grupper ble det tatt ut bukorganer (hodenyre og mage/tarm med blindsekker og milt) og gjeller på formalin, samt prøver av hodenyre og milt på RNAlater®. I tillegg ble det tatt ut så mye blod som mulig fra halevenen (*vena caudalis*) hos samtlige fiskegrupper 21, 42 og 84 dager etter immunisering, ved hjelp av enten BD vacutainer-nåler (0,7 x 25 mm) eller ved hjelp av sprøyter (1 ml) med BD nåler (0,5 x 16 mm el. 0,6 x 25 mm) for små fisk. Blodprøvene ble samlet på røde BD CAT-vacutainere (Clot Activator Tubes), og oppbevart på is frem til videre behandling.

### 3.5.2 Bearbeiding og lagring av prøver

Vevs-prøver på formalin ble lagret i romtemperatur i 48 timer før videre behandling. Disse ble deretter tatt ut og overført til perforerte plastkassetter, før formalin ble skylt av i PBS og prøvene ble overført til 70% etanol for langtidslagring. Prøver på RNAlater® ble oppbevart i kjøleskap (ved 4 °C) ON, før videre lagring i fryser ved - 20 °C.

Blodprøvene ble transportert på is til labben på NFH, og ble deretter sentrifugert innen 5 timer etter prøveuttaket. Sentrifugeringen foregikk i en Heraeus Multifuge 1 S-R sentrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) i 10 minutter ved 3000 rpm. og 4 °C. Serumet, som da hadde lagt seg som et lag (supernatant) over blodcellene, ble videre pipettert over på eppendorfrør og lagret ved - 20 °C for videre behandling.

Det ble laget serum-pools fra individ-serum for de forskjellige gruppene. For Gr. 1 ble dette gjort etter lagring (ved - 20 °C) på NFH. Her ble 20 µl serum fra hver av fiskene overført til et nytt, felles eppendorfrør. For Gr. 2 ble serum-pools laget til i felt, i sammenheng med prøvetaking. Dette ble gjort for å få mest mulig serum totalt fra individ-prøver (serum) på rundt 0,1 ml (eller mindre) pr. fisk.

Videre analyser av prøver på RNAlater® fra Gr. 1, og samtlige prøver fra Gr. 2 (med unntak av enkelte serum-prøver), ble av tidsmessige årsaker ikke gjennomført i denne oppgaven. Andre data for Gr. 2 (vekst og dødelighet etc.), ble av samme årsak heller ikke videre bearbeidet.



## 3.6 Analyser

### 3.6.1 Registrering av velferdsindikatorer

#### a) Vekstutvikling

Fiskens spesifikke vekstrate (SGR) over tid (fra engelsk: *specific growth rate*), er en egnet indikatorer på dyrevelferd (57). Syk, stresset eller skadet fisk spiser som regel mindre enn tilsvarende friske individer, noe som fører til lavere tilvekst (58). I dette forsøket ble fiskens vekt registrert i forkant av immunisering, med påfølgende registreringer ved samtlige prøveuttak etter forsøksstart. SGR ble benyttet for å illustrere eventuelle forskjeller i tilvekst mellom gruppene. Grunnet manglende individmerking og mulighet til å følge enkeltindivider i forsøket, ble SGR beregnet ut fra gruppevis gjennomsnittsvekt for vekstperiodene mellom de forskjellige prøveuttakene. SGR ble beregnet etter følgende metode, hentet fra ref. (59).

Spesifikk vekstrate er et uttrykk for prosentvis daglig vekst mellom to måletidspunkter, og kan beregnes ut fra følgende formel:

$$SGR = 100 \times (\ln W2 - \ln W1) / T$$

Ln W1 og ln W2 står for logaritmen til fiskens gjennomsnittsvekt ved henholdsvis første og andre måletidspunkt. T er tiden (antall dager) mellom disse.

### b) Speilbergs skala

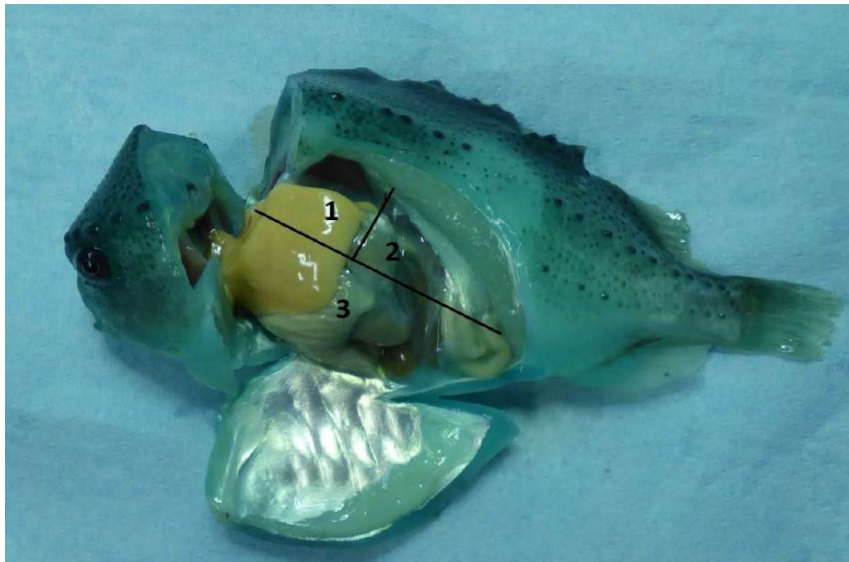
Ved kommersiell oppdrett av laks i Norge, er det i dag lovpålagt med vaksinerings mot enkelte bakteriesykdommer før utsett i sjø (3). Vaksinerings via IP injeksjon av oljebaserte vaksiner, er den mest vanlige metoden (34). Denne formen for vaksinerings, vil i mange tilfeller kunne gi forskjellige former for bivirkninger og skader i bukhalen, og små til moderate bivirkninger er ansett som akseptable (38). For å evaluere slike bivirkninger, er det i dag vanlig å benytte seg av Speilbergs skala (8), som rangerer adheranser i bukhalen (fra 0-6) hos laks etter omfang og alvorlighetsgrad. Etter denne skalaen regnes scoringer mellom 1-2 for å være av en slik grad at det ikke påvirker fiskens vekst og velferd, mens høyere scoringer vil kunne gi en variert grad av negative innvirkninger. I dette forsøket ble det benyttet en modifisert variant av Speilbergs skala utarbeidet av Vaxxinoa Norway AS, som vist i tabell 7. Andre parametere for vaksinebivirkninger og vaksineskader (se figur 4 og tabell 8-11) ble registrert som tilleggsm informasjon.

**Tabell 7. Modifisert Speilbergs skala (kilde: Vaxxinoa Norway AS).**

Grad	Beskrivelse
0	Ingen synlige forandringer i bukhalen.
1	Svake sammenvoksinger i et begrenset område, ofte som bindevevstråder rundt injeksjonssted. Lett å løsne.
2	Moderate sammenvoksinger mellom organ og/eller mellom organ og bukvegg. Større utbredelse og/eller sitter fastere enn grad 1. Lett å løsne.
3	Tydelige sammenvoksinger mellom organ og/eller mellom organ og bukvegg. Lever og/eller svømmeblære kan være festet til organ. Sammenvoksinger sitter fastere og/eller har større utbredelse enn grad 2.
4	Til dels kraftige sammenvoksinger mellom organ og/eller mellom organ og bukvegg. Involverer store deler av bukhalen. Sammenvoksinger er vanskelig å løsne uten å skade organ og/eller bukhinne. Organ kan fremstå som en pakke og granulom kan finnes i avgrensede områder.
5	Som for grad 4, men med større utbredelse. Bukhinne skades ved fjerning av organ. Tilstedeværelse av granulom i organ og/eller mellom organ og bukvegg.
6	Som for grad 5, men involverer alle organer i bukhalen. Tilstedeværelse av store granulom i organ, eller mellom organ og bukvegg. Organpakke lar seg ikke fjerne uten tydelige skader på bukhinne og filet.

**Tabell 8. Lokalisering av adheranser i bukhulen (kilde: Vaxxinoa Norway AS).**

Lokalisering	Beskrivelse
Lok. 1	Kraniale deler av bukhulen, inkludert svelg, dorsal del av lever samt fremre del (halvdel) av svømmeblære avgrenset av bakre kant av lever
Lok. 2	Dorsale deler av bukhulen fra bakkant av lever mot svømmeblære inkludert baktarm
Lok. 3	Ventrale deler av bukhole, deler av bukhulen som ikke dekkes av lokalisering 1 og 2



**Figur 4. Lokalisering (1-3) av adheranser.**

Foto og red.: Eivind Isdal, Vaxxinoa Norway AS.

**Tabell 9. Gradering av melanin i bukorganer (kilde: Vaxxinoa Norway AS).**

Grad	Beskrivelse
0	Ingen synlig melanin på indre organ
1	Synlig melanin i små mengder og i avgrenset område
2	Mye melanin i avgrenset område eller moderat melanin over større område
3	Mye melanin på eller i organ, over store områder/alle organ

**Tabell 10. Gradering av melanin i bukhinne/muskel (kilde: Vaxxinoa Norway AS).**

Grad	Beskrivelse
0	Ingen synlig melanin på bukhinne
1	Synlig melanin i små mengder og i avgrenset område, lar seg enkelt fjerne
2	Mye melanin i avgrenset område eller moderat melanin over større område, vanskelig å fjerne uten å skade bukhinne
3	Mye melanin på eller i filet, over store områder. Lar seg ikke fjerne uten å skade bukhinne/muskel

**Tabell 11. Gradering av vaksinerester i bukhalen (kilde: Vaxxinoa Norway AS).**

Grad	Beskrivelse
0	Ingen synlige vaksinerester
1	Små mengder vaksinerester innkapslet i depot/dråper og i begrenset antall depot
2	Fritflytende vaksine og eller større depot/dråper på/i organ
3	Større mengder fritflytende vaksine, som når fisken er nyvaksinert

### *c) Dødelighet*

Registrering av dødelighet ble i dette forsøket gjort av røktere eller forsøkspersonell i sammenheng med prøveuttak, daglige temperaturmålinger og/eller ved annen visuell kontroll av forsøkskar. Dødfisk ble håvet opp og dissekert ved påvisning, eller frosset ned (ved -20 °C) i påvente av videre bearbeiding.

### 3.6.2 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) er en kvantitativ analysemetode som ofte brukes for å detektere og kvantifisere antigener eller antistoffer i en gitt løsning. Metoden utnytter affiniteten mellom et gitt antigen og dets spesifikke antistoff. Ved å tilsette et enzymkoblet sekundært antistoff, etterfulgt av substrat-tilsetting, får man en fargeendring som kan måles ved optisk tetthet (OD) i et spektrofotometer (60). I dette forsøket ble ELISA benyttet for å gradere (kvantifisere) antistoffrespons hos rognkjeks etter vaksinerings.

#### *a) Inaktivering og behandling av bakterie-prøver*

Inaktiverede bakterieprøve, for bruk i ELISA, ble mottatt fra produsent (Vaxxinova Norway AS). Antall celler pr. ml løsning ble oppgitt i CFU (colony forming units) fra produsent, en måleenhet som angir antall koloniformige enheter. Dette ble omregnet til et totalt antall celler pr. ml løsning ved bruk av et Bürker tellekammer (Brand, Tyskland).

For ELISA-testen ble det gjort forsøk med hele (HC) og ultrasonikerte (US) bakterieceller. Erfaringer fra tidligere forsøk av Toni Erkinharju (pers. med. Toni Erkinharju, januar 2016), har vist at bakterieløsninger med US bakterieceller gir bedre (jevne) binding i brønnene, enn løsninger med HC bakterieceller. For å sikre best mulig resultat, valgte man likevel å teste begge metodene for behandling av bakterier

Sonikering av bakterieløsninger foregikk i en Sonopuls HD 60 sonikeringsmaskin (BANDELIN electronic GmbH & Co., Tyskland) kontinuerlig i 30 sekunder, og ved 80% styrke.

### b) Tillaging av prøver og kontroller for ELISA

Det ble i første omgang gjennomført et pilotforsøk med fire ELISA-plater, med serum-pools fra fisk i Gr. 2 fra dag 42. Hensikten med dette var å teste forskjellige fortyninger, og finne en egnet positiv kontroll for resten av ELISA-målingene.

Høyest respons i pilotforsøket ble målt for den IP vaksinerte V1-gruppen, og denne serum-prøven ble derfor valgt som positiv kontroll. Det ble samtidig testet fortyninger, og resultatet gjorde at hovedforsøket ble gjennomført med triplikater av to forskjellige fortyninger: 1:100 og 1:200.

Det ble laget fire forskjellige plateoppsett, slik at hvert oppsett kunne brukes til å sammenligne aktuelle faktorer (V1 vs. V2 og IM vs. IP). De forskjellige plateoppsettene er illustrert i appendiks IV. Dette oppsettet muliggjør sammenligninger av faktorer, uten sammenligning av forskjellige plater. Beregninger av plateforskjeller (normalisering av plater) blir derfor unødvendig.

I tillegg til serum-prøvene som ble undersøkt i hovedforsøket, ble følgende tillaget:

Positiv kontroll (PK):

Serum-pools fra IP-fisk (V1 i Gr. 2) fra dag 42.

Negativ kontroll (NK):

Serum-pools fra uvaksinert fisk (kar A14) fra dag 0.

“Ukjente“ (serum-prøver):

Serum-pools fra Gr. 1 (IP- og IM-fisk - V1, V2, PBS).

“Blanks“:

Brønner kun tilsatt 100 µl analyse-buffer.

### c) Gjennomføring av ELISA

Nittiseks-brønners mikro-titer plater (Nunc MaxiSorp fra Thermo Fisher Scientific Inc., USA) fikk tilsatt 100 µl pre-coatingbuffer, og ble inkubert i 5 min ved romtemperatur (RT). Dette ble etterfulgt av tre gangs vasking med 200 µl PBST (fast vaskeprosedyre), og videre coating med en av fire inaktiverede bakterietyper: *A. salmonicida* gr. 5, *A. salmonicida* gr. 6, *V. anguillarum* O1, eller *M. viscosa*. Hver brønn fikk da tilsatt 100 µl bakterie-løsning ( $10^8$  celler/ml i coating-buffer) med enten HC eller US bakterieceller. Platene ble deretter satt til sentrifugering (10 min ved 1.000 rpm. ved 4 °C), før inkubering ved 4 °C over natten (ON).

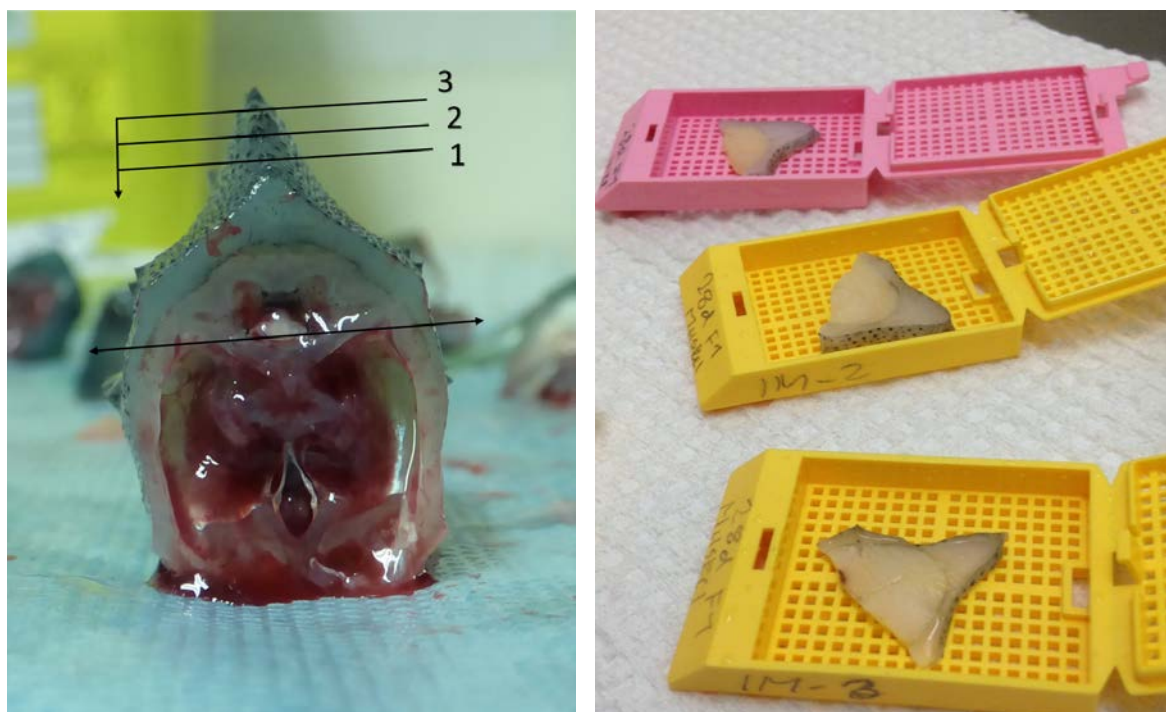
Påfølgende dag ble platene vasket før tilsetning av 200 µl blokkeringsbuffer, og deretter inkubering i 2 timer ved RT. Blokkering gjøres for å forhindre uspesifikk binding i brønnene. Etter vasking ble platene enten tatt videre i prosessen, eller de ble lagret ved -20 °C for senere bruk. Det ble videre tilsatt 100 µl rognkjeks serum (serum-pools i analysebuffer) pr. brønn, fordelt på triplikater med 1:100 og 1:200 fortynning. Brønner med kontrollserum (NK og PK) og "blanks" ble også tillaget. Platene ble deretter inkubert ved 4 °C ON.

Dagen etter ble platene vasket, før samtlige brønner fikk tilsatt 100 µl kanin anti-rognkjeks IgM serum (Vaxxinova Norway AS), fortynnet 1:400 i analysebuffer. Platene ble inkubert i 1 time ved RT. Etter inkubering, samt påfølgende vasking, ble det tilsatt 100 µl alkalisk fosfatase-konjugert sekundært antistoff (geit anti-kanin IgG; Sigma-Aldrich Co.), fortynnet 1:400 i analysebuffer. Platene ble inkubert i 1 time ved RT, og så vasket før tilsetning av 100 µl substrat-løsning og inkubering (mørkt) i 30 min ved RT. Deretter, umiddelbart etter endt inkuberingstid, ble OD avlest i et spektrofotometer (VersaMax Absorbance Microplate Reader; Molecular Devices, LLC, USA) ved en bølgelengde på 405 nm.

### 3.6.3 Histologi

Mikroanatomi, eller histologi, er læren om vevets naturlige oppbygging og sammensetning. For å kunne påvise patologiske endringer i vevet (histopatologi) grunnet sykdom, skade eller infeksjon, er kunnskap om vevets naturlige tilstand essensielt. Histologiske undersøkelser omfatter mikroskopering av fargede snitt av vev (38), og er av høy viktighet for å kunne påvise sykdom, spesielt i tilfeller der makroskopiske sykdomstegn er vanskelige å detektere.

I dette forsøket ble histologiske undersøkelser gjennomført med den hensikt å påvise eventuelle negative innvirkninger av vaksinerings. Forskjellige grader av inflammasjon i vevet, ble benyttet som indikator på negativ innvirkning. Ved prøveuttak ble det gjennomført en kombinasjon av et horisontalsnitt langs fiskens ryggvirvel, og tre transversalsnitt fra dorsal side mot ryggvirvel. Dette resulterte i tre vevsbiter fra ryggmuskulaturen, som ble nummerert fra 1-3. Dette illustreres i figur 5.



Figur 5. Metode for uttak og bearbeiding av vevsprøver fra rognkjeks (snitt 1-3).

Foto: Martin Rønbeck Lundberg



*a) Dehydrering og innstøping*

Kassetter med vevsprøver (fra lagring på 70 % etanol) ble satt til dehydrering etter tabell 12 ON i en Citadel 2000 vevs-prosessor (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Påfølgende dag ble vevsbitene tatt ut og innstøpt i blokker av parafinvoks (Histowax® fra Histolab Products AB, Sverige) ved hjelp av en Leica EG 1150H innstøpningsmaskin (Leica Biosystems, Tyskland). Blokkene ble lagret ved RT for videre behandling.

**Tabell 12. Dehydreringstrinn etter program A1 i Citadel 2000.**

Kar nr.	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

*b) Snitting av vevsprøver*

Etter lagring ble blokkene nedkjølt på is før snitting, som ble gjennomført i en Leica RM2235 mikrotom (Leica Biosystems GmbH, Tyskland). I første omgang ble det snittet ned til ønsket dybde i vevet, før blokkene ble lagt til dekalsifisering i 10 % HCl i 60 min. Dette ble gjort etter anbefalinger og metoder fra Veterinærinstituttet (pers. med. Kristian Hoel, Veterinærinstituttet, januar 2016). Prøvene ble deretter videre snittet ved 7 µm og overført til vannbad (42 °C) og objektglass. De ferdige snittene ble satt til tørking i varmeskap ved 60 °C i 30 min.

*c) Farging og montering*

Shandon Instant Hematoxylin og Eosin (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ble benyttet for farging av snitt. De forskjellige reagensene ble preparert i henhold til beskrivelse fra produsent.

For å fjerne overflødig parafinvoks, som fører til ufullstendig farging av vev, ble snittene først inkubert 4 minutter i HistoClear™ (National Diagnostics Inc., UK). Deretter ble prøvene overført til en Leica ST4020 Small Linear Stainer (Leica Biosystems, GmbH, Tyskland) for videre deparafinisering, og farging i henhold til metoder oppført i tabell 13. Etter farging, ble dekkglass montert på snittene ved hjelp av et ikke-vannløselig monteringsmedium (Eukitt® fra Sigma-Aldrich Co., USA), før langtidslagring ved RT i påvente av videre analyser.

**Tabell 13. Deparafinisering og farging i Leica ST4020 (90 sekunder i hvert kar).**

Kar nr.	Innhold
<b>1</b>	Histoclear™
<b>2</b>	2. 100 % etanol
<b>3</b>	3. 96 % etanol
<b>4</b>	4. 96 % etanol
<b>5</b>	5. Vann
<b>6</b>	6. Hematoxylin
<b>7</b>	7. Hematoxylin
<b>8</b>	8. Vann
<b>9</b>	9. Vann
<b>10</b>	10. Eosin
<b>11</b>	11. 96 % etanol
<b>12</b>	12. 96 % etanol
<b>13</b>	13. 100 % etanol
<b>14</b>	14. 100 % etanol
<b>15</b>	15. HistoClear™

### 3.6.4 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi er en analysemetode som benyttes for å påvise tilstedeværelse av spesifikke antigener i histologiske snitt (61). Dette gjøres ved å inkubere vevssnitt med spesifikke antistoffer mot det antigenet man ønsker å detektere, etterfulgt av et sekundært antistoff koblet til et målbart reporter-molekyl. I dette forsøket ble immunhistokjemi benyttet for å påvise tilstedeværelsen av vaksine i muskelsnitt av rognkjeks, hvor *V. anguillarum* O1 var inkludert i vaksinen.

#### a) Dehydrering, innstøping og snitting av vev

Dehydrering, innstøping og snitting av vev ble gjort etter samme metoder som for histologi (se delkapittel 3.6.3 a), med unntak av enkelte forskjeller for å sikre best mulig feste til objektglassene: 1) snittene ble tørket i varmeskap ved 60 °C ON og 2) det ble benyttet spesielle objektglass (Poly-Prep Slides) for immunhistokjemi (Sigma-Aldrich Co., USA).

#### b) Deparafinisering og rehydrering

For å fjerne overflødig parafinvoks, som fører til ufullstendig farging av vev, ble snittene først satt til deparafinisering i 2 x 10 min i HistoClear™. Rehydrering av snittene ble deretter gjennomført i henhold til tabell 14.

Tabell 14. Rehydrering av snitt til immunhistokjemi

Kar nr.	Innhold	Tid
1	HistoClear™	2 x 10 min
2	100 % etanol	2 x 5 min
3	90 % etanol	2 min
4	70 % etanol	2 min
5	50 % etanol	2 min
6	Rennende kaldt vann	1 x 5 min (eller inntil antigengjenvinning)

*c) Blokking og immunhistokjemisk farging*

Overflødig væske etter rehydrering ble helt av ved å bikke objektglassene på siden, og eventuelle rester ble fjernet ved hjelp av trekkpapi. (Den samme metoden ble benyttet gjennom hele prosessen). Snittene ble deretter ringet inn (isolert) ved hjelp av en Dako-penn (Dako Denmark A/S). Etter isolering ble snittene vasket 2 x 3 min i henholdsvis TBS og TBST, før overføring til fukt-kammer og videre tilsetting av blokkeringsbuffer. Det ble tilsatt mellom 100-200 µl løsning for hver av etappene i prosessen (nok til å dekke og danne dråpe over snittet). Inkuberingstid for blokkering og antistoff-binding var på 30 min ved RT.

Etter endt blokkering, ble overflødig blokkeringsbuffer vasket av med TBST, før tilsetting av primært antistoff (kanin anti-*V. anguillarum* O1 fra NFH, produsert av personale fra Forskningsstiftelsen ved Universitetet i Tromsø) fortynnet 1:500 i TBST. Snittene ble deretter vasket 2 x 5 min i TBS, før tilsetting av alkalisk fosfatase-konjugert sekundært antistoff (geit anti-kanin IgG, Sigma-Aldrich Co.).

Snittene ble deretter vasket 2 x 5 min i henholdsvis TBST og TBS, før tilsetting av substratløsning (1 tablett SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol (Sigma-Aldrich Co.) pr. ml dH<sub>2</sub>O), etterfulgt av 10 min inkubering ved RT. Reaksjonen ble stoppet etter endt inkubering ved at substratløsningen ble skylt av i rennende, kaldt vann, før snittene ble kontrastfarget i henhold til oppsett i tabell 15. Etter farging ble dekkglass montert på snittene ved hjelp av et vannløselig (hydrofilt) monteringsmedium (ImmunoHistoMount™ fra Sigma-Aldrich Co.).

Tabell 15. Oppsett for kontrastfarging av vevssnitt.

<b>Kar nr.</b>	<b>Innhold</b>	<b>Tid</b>
1	dH <sub>2</sub> O	5 min
2	Hematoxylin	1 min
3	Rennende vann	10 min
4	dH <sub>2</sub> O	2 min

### *3.6.5 Mikroskopering og analyser av snitt*

Histologiske og immunhistokjemiske snitt ble analysert via et Axio Lab.A1 lysmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Tyskland). Bilder ble tatt via et montert Moticam 5.0 MP kamera (Motic®, USA), og videre bearbeidet i programmet Motic Images Plus 2.0 (software fra Motic®).

### 3.6.6 Statistiske analyser og grafiske framstillinger

Innsamlede data ble behandlet ved hjelp av programvaren Excel 2013 for Windows (Microsoft Co., USA), og statistiske analyser ble gjennomført i Excel ved hjelp av tilleggsprogrammet «*Analysis ToolPak*» (analyseverktøy).

All innsamlet data som ble analysert og presentert i oppgaven, ble antatt normalfordelt eller tilnærmet normalfordelt. Det ble testet for statistiske gruppeforskjeller, og det ble benyttet en-faktors variansanalyse (ANOVA) som beskrevet i pensumboken «Statistikk for universiteter og høyskoler» (62). Gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Ved presentasjon av resultater i grafer og figurer, ble statistiske gruppeforskjeller annotert ved hjelp av bokstavkombinasjoner (a, b, c, d) eller tegn (\*\*):

Eksempel på bruk av bokstavkombinasjoner:

ab = signifikant forskjell mellom gruppe a og b

ac = signifikant forskjell mellom gruppe a og c

dab = signifikant forskjell mellom gruppe d, a og b

Hvis det ble vist signifikant forskjell mellom f.eks. gruppe «a» og samtlige andre grupper, annoteres dette med:

\*\* = signifikant forskjell mellom alle grupper

## 4. Resultater

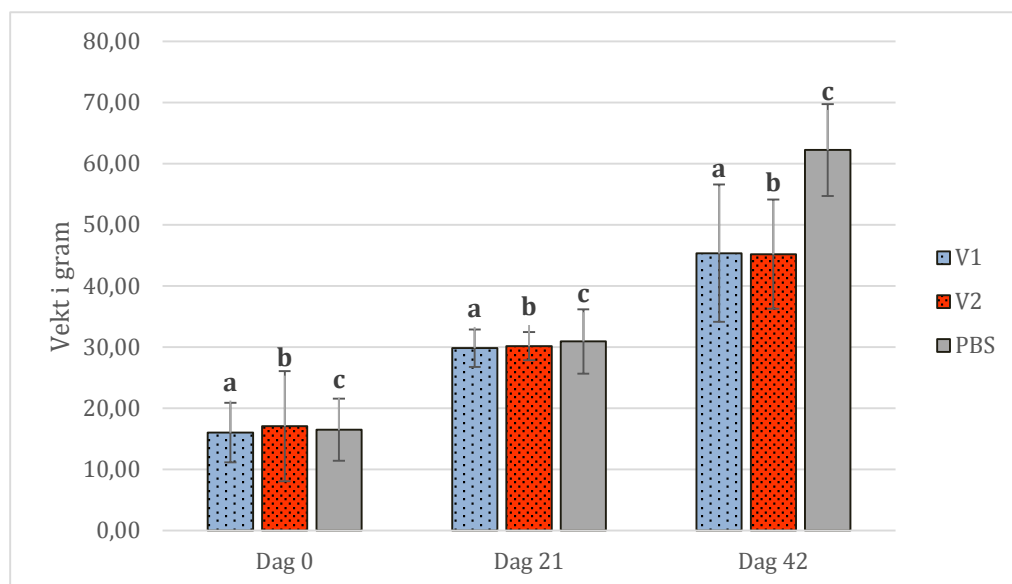
### 4.1 Velferdsindikatorer

#### 4.1.1 Vektøkning etter immunisering

##### a) Tilvekst for IM-grupper – V1 vs. V2

Totalt 186 rognkjeks ble immunisert IM, med to ulike vaksiner (V1 og V2) eller PBS. Vekt ble registrert før immunisering, og ved samtlige prøveuttak fra dag 0 – dag 84.

Figur 6 viser gjennomsnittsvekt for IM injiserte fiskegrupper (V1, V2, PBS) i Gr. 1. Vekstkurven ble beregnet ut fra veiing ved forsøksstart på dag 0, samt utvalgte prøveuttak på dag 21 og 42. Vektdata fra dag 84 ble ikke benyttet her, grunnet stor variasjon i antall fisk mellom dette og andre uttak. Antall fisk (n) ved de utvalgte uttakene varierte: dag 0 (n=62), dag 21 (n=10 for V1 og PBS og n=4 for V2), dag 42 (n=10). Vektdata for de forskjellige gruppene ble analysert statistisk, og gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).



**Figur 6. Vektøkning etter forsøksstart for IM injiserte fiskegrupper i Gr. 1.**

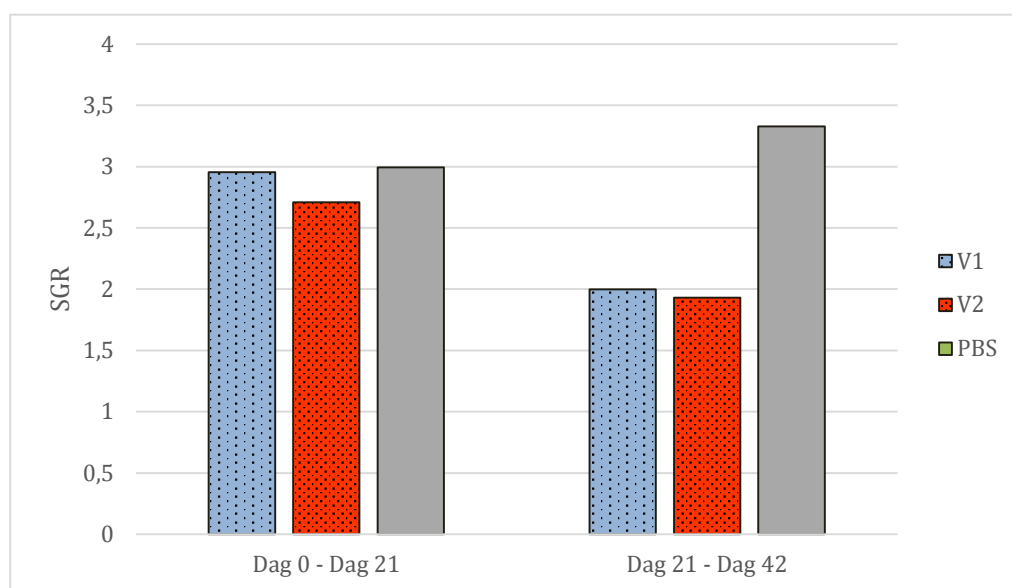
Gjennomsnittsvekt ± standardavvik ved forsøksstart (dag 0) (n=62), samt ved utvalgte prøveuttak ved dag 21 (n=10 for V1 og PBS, og n=4 for V2) og dag 42 (n=10). Kombinasjoner av forskjellige bokstaver (a, b, c) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller.

Gjennomsnittsverdier fra andre målinger står oppført i appendiks II.

## Resultater

Resultatene viste en tilnærmet lik vekstutvikling for samtlige fiskegrupper frem t.o.m. dag 21, med en ca. dobling av vekt fra 16-17 gram på dag 0 til 30 gram på dag 21. Etter dette kan vi se en høyere økning for PBS-gruppen enn for vaksinerte grupper, med en differanse på henholdsvis 16,87 (PBS vs. V1) og 17,03 (PBS vs. V2) gram ved dag 42. Statistiske analyser viste derimot ikke signifikante gruppeforskjeller i perioden.

SGR-verdiene for de samme gruppene, for vekstperiodene fra dag 0 til dag 21 og fra dag 21 til dag 42, er vist i figur 7.



**Figur 7. SGR for IM injiserte fiskegrupper i Gr. 1.**

SGR (fra gjennomsnittsvekt) for vekstperiodene mellom dag 0 – dag 21 og dag 21 – dag 42. Antall fisk (n) varierte: dag 0 (n=62), dag 21 (n=10 for V1 og PBS, og n=4 for V2) og dag 42 (n=10).

Resultatene for SGR viste at tilveksten var redusert for begge de vaksinerte gruppene etter dag 21, samtidig som tilveksten hos PBS-gruppen fortsatte å øke (fra SGR på 2,99 til 3,33) i den samme perioden.

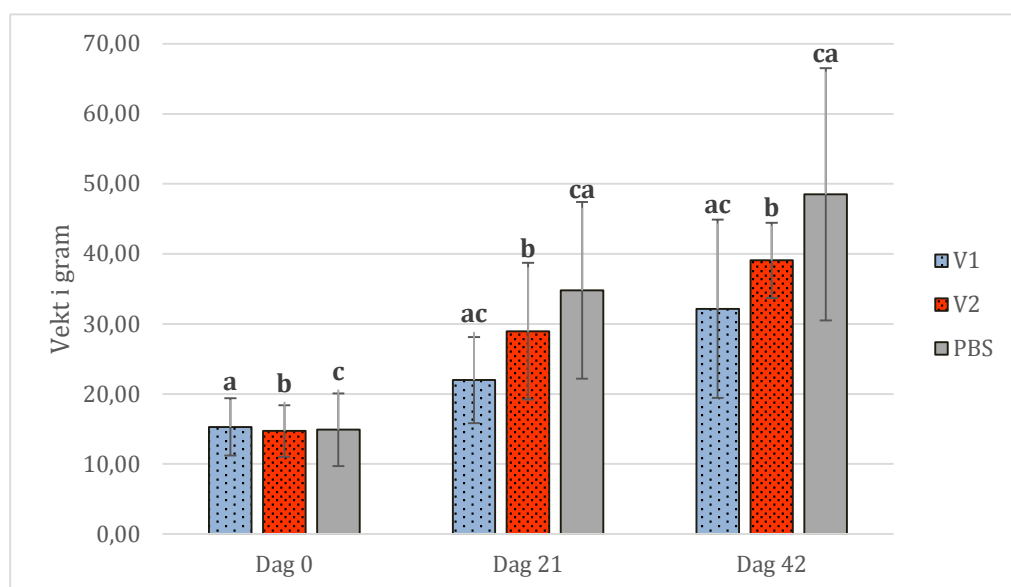
SGR ble beregnet ut fra gruppevis gjennomsnittsvekt, grunnet manglende individmerking og mulighet til å følge enkeltindivider i forsøket.



### b) Tilvekst for IP-grupper – V1 vs. V2

Totalt 75 rognkjeks ble immunisert IP, med to ulike vaksiner (V1 og V2) eller PBS. Lengde og vekt ble registrert ved samtlige prøveuttak fra dag 0 til dag 84.

Figur 8 viser gjennomsnittsvekt for IP injiserte fiskegrupper (V1, V2, PBS) i Gr. 1. Vekstkurven ble beregnet ut fra veiing ved forsøksstart på dag 0, samt utvalgte prøveuttak på dag 21 og 42. Vektdata fra dag 84 ble ikke benyttet her, grunnet stor variasjon i antall fisk mellom dette og andre uttak. Antall fisk (n) ved de utvalgte uttakene varierte: dag 0 (n=25), dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10). Gjennomsnittsverdiene ble analysert statistisk, og gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).



**Figur 8. Vektøkning etter forsøksstart for IP injiserte fiskegrupper i Gr. 1.**

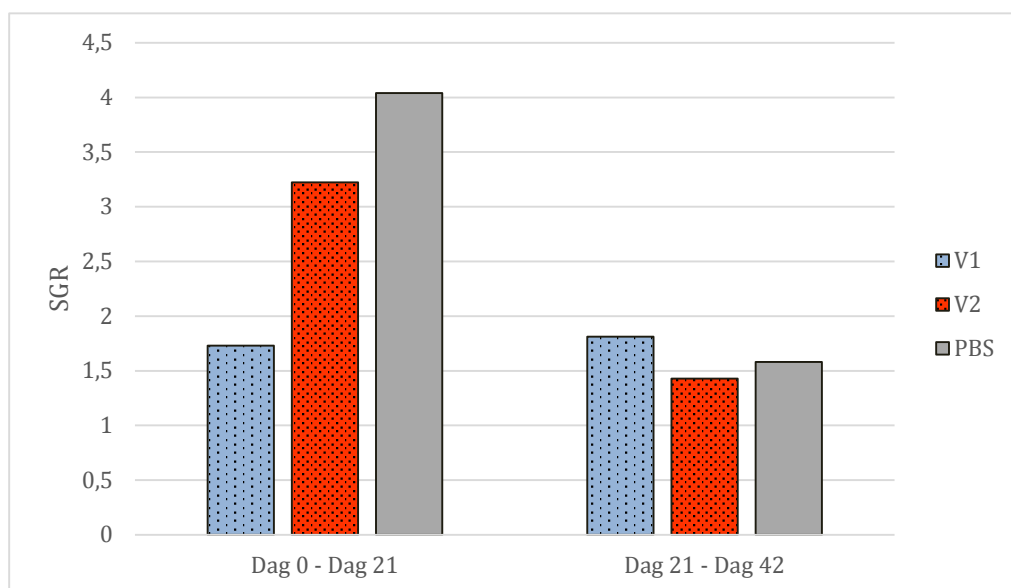
Gjennomsnittsvekt  $\pm$  standardavvik ved forsøksstart (dag 0) (n=25), samt ved utvalgte prøveuttak ved dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10). Kombinasjoner av forskjellige bokstaver (a, b, c) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller.

Gjennomsnittsverdier fra andre målinger står oppført i appendiks II.

Resultatene viste en tilnærmet lik gjennomsnittsvekt på ca. 15 gram for samtlige grupper på dag 0, og en deretter høyere tilvekst for V2- enn for V1-gruppen t.o.m. dag 42. Differansen mellom gruppene (V2-V1) var på henholdsvis 6,97 og 6,91 gram på dag 21 og dag 42. Disse forskjellene ble ikke vist signifikant ved statistiske analyser.

En høyere vekstøkning ble samtidig observert for PBS-gruppen sammenlignet med vaksinerte grupper, med en differanse på henholdsvis 12,82 (PBS-V1) og 5,85 (PBS-V2) gram på dag 21, og 16,34 og 9,43 gram på dag 42. Statistiske analyser bekrefter signifikant forskjell mellom V1- og PBS-gruppen ved dag 21 og 42, men ikke for V2-gruppen.

SGR-verdiene (se figur 9) for vekst-perioden fra dag 21 til dag 42, viste derimot en høyere gjennomsnittlig tilvekst for V1-gruppen enn for de andre gruppene, og en tilnærmet lik eller lavere gjennomsnittlig tilvekst for PBS-gruppen, sammenlignet med vaksinerte grupper etter dag 21.



**Figur 9. SGR for IP injiserte fiskegrupper i Gr. 1.**

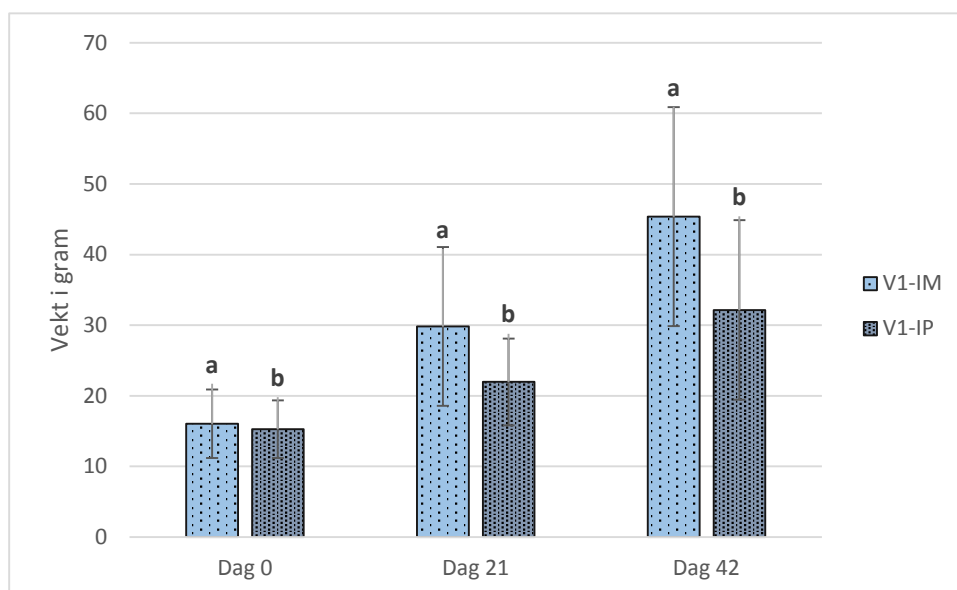
Gjennomsnittlig SGR for vekst-periodene mellom dag 0 – dag 21 og dag 21 – dag 42.  
Antall fisk (n) varierte: dag 0 (n=25), dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10).

Vekst-raten til V1-gruppen forholder seg ganske stabil fra dag 0 til dag 21, og fra dag 21 til dag 42, hvor SGR-verdiene ligger på mellom 1,7 og 1,8 for begge måletidspunkt. V2- og PBS-gruppen har de høyeste SGR-verdiene for perioden fra dag 0 til dag 21 (henholdsvis 3,22 og 4,04), men faller til henholdsvis 1,43 og 1,58 for perioden fra dag 21 til dag 42.

SGR ble også her beregnet ut fra gruppevis gjennomsnittsvekt, grunnet manglende individmerking og mulighet til å følge enkeltindivider i forsøket.

### c) Tilvekst for V1-grupper – IM vs. IP

Figur 10 viser samlede resultater for vaksinerte fiskegrupper (V1) i Gr. 1, etter IM eller IP vaksineringsmetode. Vekstkurven ble beregnet ut fra veiing ved forsøksstart på dag 0, samt utvalgte prøveuttak på dag 21 og 42. Antall fisk (n) ved disse uttakene varierte. For IM-grupper: dag 0 (n=62), dag 21 (n=10), dag 42 (n=10). For IP-grupper: dag 0 (n=25), dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10). Vektdata for de forskjellige gruppene ble analysert statistisk, og gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).



**Figur 10. Vektøkning etter forsøksstart for IM og IP injiserte fiskegrupper (V1) i Gr. 1.**

Gjennomsnittsvikt ± standardavvik ved forsøksstart. Antall fisk (n) varierte.

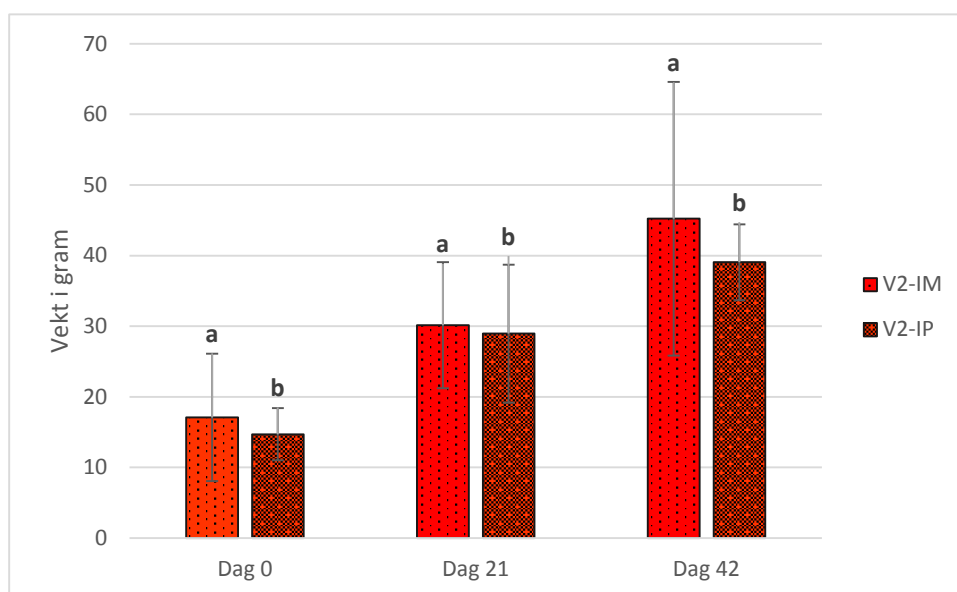
For IM-grupper: dag 0 (n=62), dag 21 (n=10), dag 42 (n=10).

For IP-grupper: dag 0 (n=25), dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10). Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a, b) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller.

Statistiske analyser avdekket ingen signifikante gruppeforskjeller mellom vaksinerte grupper ved IM/IP injeksjon av V1 frem t.o.m. dag 42.

*d) Tilvekst for V2-grupper – IM vs. IP*

Figur 11 viser samlede resultater for vaksinerte fiskegrupper (V2) i Gr. 1, etter IM eller IP vaksineringsmetode. Vekstkurven ble beregnet ut fra veiing ved forsøksstart på dag 0, samt utvalgte prøveuttak på dag 21 og 42. Antall fisk (n) ved disse uttakene varierte. For IM-grupper: dag 0 (n=62), dag 21 (n=4), dag 42 (n=10). For IP-grupper: dag 0 (n=25), dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10). Vekstdata for de forskjellige gruppene ble analysert statistisk, og gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).



**Figur 11. Vektøkning etter forsøksstart for IM og IP injiserte fiskegrupper (V2) i Gr. 1.**

Gjennomsnittsvikt ± standardavvik ved forsøksstart. Antall fisk (n) varierte.

For IM-grupper: dag 0 (n=62), dag 21 (n=4), dag 42 (n=10).

For IP-grupper: dag 0 (n=25), dag 21 (n=10) og dag 42 (n=10). Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a, b) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller.

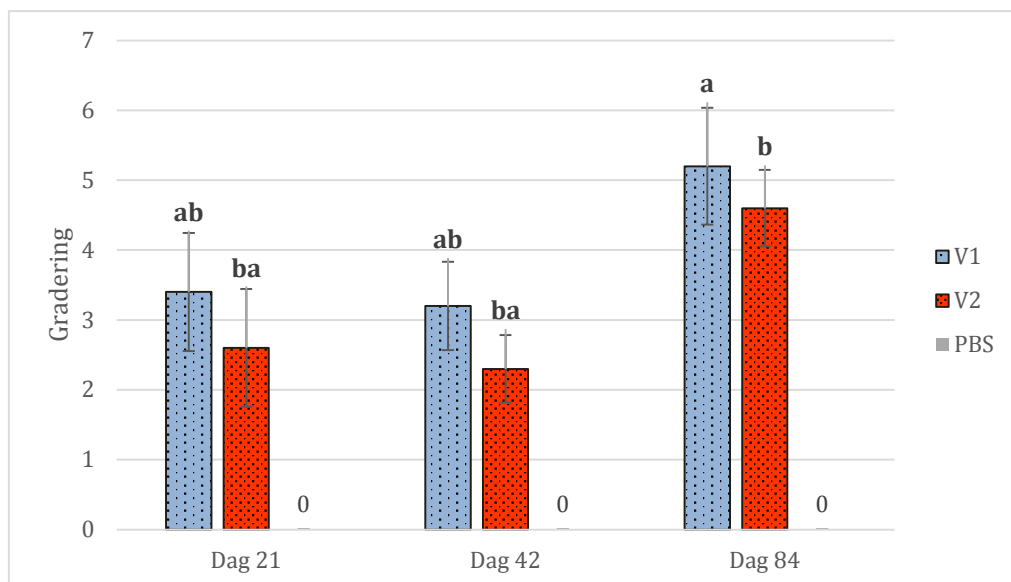
Statistiske analyser avdekket ingen signifikante gruppeforskjeller mellom vaksinerte grupper ved IM/IP injeksjon av V2 frem t.o.m. dag 42.

### 4.1.2 Scoring av bivirkninger – IP-grupper

#### a) Speilberg-scoring

Scoring etter Speilbergs skala, er en subjektiv analysemetode som benyttes for å gradere adheranser i bukhulen etter omfang og alvorlighetsgrad.

Figur 12 viser gjennomsnittsscoreing av adheranse hos IP injiserte fiskegrupper (V1, V2, PBS) i Gr. 1. Gjennomsnitt ble beregnet ut fra totalt antall fisk (n) undersøkt ved de forskjellige uttakstidspunktene: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=5). Gjeldende data for de forskjellige gruppene ble analysert statistisk, og gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).



**Figur 12. Oversikt over adheranse-scoring over tid.**

Scoring av adheranser  $\pm$  standardavvik for måletidspunktene på dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=5). Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a og b) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller. All PBS-fisk fikk grad 0.

I dette forsøket ble alle grader av adheranser (0-6) observert, med fullt utspredd lokalisering (1-3). Resultatene viste en høyere scoring for V1-gruppen enn for V2-gruppen ved alle måletidspunktene. Adheranser ble ikke observert hos PBS-gruppen. Statistiske analyser viste signifikant forskjell mellom V1- og V2-gruppen på dag 21 og dag 42, men ikke på dag 84. PBS-gruppen ble ikke tatt med i beregningene.

Individuelle data fra de forskjellige målingene står oppført i appendiks III.

*b) Andre tegn på bivirkninger*

Andre makroskopiske indikatorer for vaksinebivirkninger som også ble registrert var: 1) melanin i bukorganer, 2) melanin i bukhinne/muskel og 3) vaksinerester i bukhulen. Tabell 16 viser gjennomsnittlig scoring av melanin og vaksinerester i bukhulen, for forskjellige grupper og tidspunkter i forsøket. Gjennomsnitt ble beregnet ut fra totalt antall fisk (n) undersøkt ved de forskjellige uttakstidspunktene: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=5). Data ble analysert statistisk, og gruppeforskjeller ble regnet som signifikant hvis p-verdien var mindre enn 0,05 ( $p < 0,05$ ).

**Tabell 16. Gjennomsnittlig gradering av melanin og vaksinerester i bukhulen.**

Figuren viser scoring av melanin og vaksinerester over tid, for måletidspunktene på dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=5). All PBS-fisk fikk score 0, både for melanin og vaksinerester.

	Dag 21			Dag 42			Dag 84		
	V1	V2	PBS	V1	V2	PBS	V1	V2	PBS
Melanin i bukorganer	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melanin i bukhinne/muskel	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vaksinerester	2	0,7	0	1,6	0	0	0,4	0,8	0

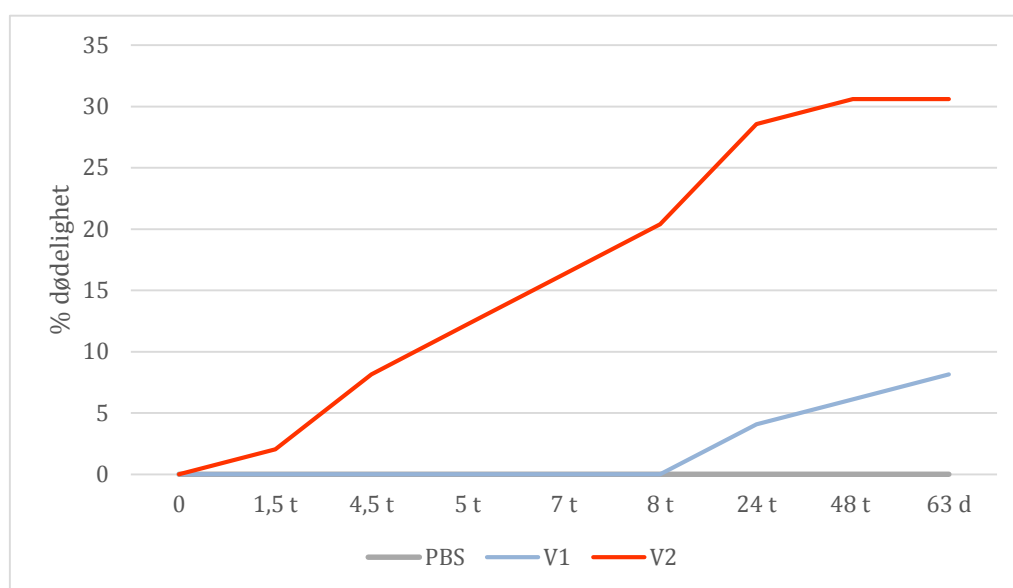
Det ble ikke observert melanin, hverken i bukorganer eller i bukhinne/muskel, og all fisk ble scoret til grad 0. For scoring av vaksinerester, ble alle grader (0-3) observert i løpet av forsøket. Resultatene viser en høyere gjennomsnittlig scoring av vaksinerester for V1-gruppen enn for V2-gruppen frem t.o.m. uttaket på dag 42. Statistiske analyser viste signifikante ( $p < 0,05$ ) forskjeller mellom vaksinerte grupper på dag 21 og 42, men ikke for dag 84.

Registreringene på dag 21 og 42, og registreringen på dag 84, ble gjort av forskjellige personer. Metoden for registrering av vaksinebivirkninger er høyst subjektiv, og endring i personell kan være en forklaring på at V2-gruppen fikk høyere score på dag 84 enn på dag 42 (fra 0 – 0,8).

Individuelle data fra de forskjellige målingene står oppført i appendiks III.

### 4.1.3 Dødelighet

Dødelighet ble i dette forsøket i hovedsak observert i løpet av de første 48 timene etter immunisering. Dødfisk ble registrert av forsøksansvarlige i perioden etter vaksinerings (på dag 0), ved ankomst på anlegget for gjennomføring av prøveuttak, eller i enkelte tilfeller på morgenen av røktere. Dødfisk-tallet ble oppdatert i løpet av besøket, eller rett før avreise fra anlegget. Avdød fisk ble liggende i karene frem til disseksjon, eller i enkelte tilfeller, frosset ned av røktere når forsøksansvarlige ikke var tilstede. Figur 13 illustrerer akkumulert dødelighet i forsøket.



**Figur 13. Prosentvis akkumulert dødelighet for IM-grupper i Gr. 1.**

Prosentvis dødelighet er beregnet ut fra antall fisk i karet ved forsøksstart (n=49). Punktene i grafen viser prosentvis dødelighet (n=1) over tid.

I løpet av dag 1 ble det registrert totalt 10 døde IM-fisk i løpet av de første 8 timene. Alle fiskene var fra V2-gruppen, og første fisk ble observert etter ca. 1,5 timer. Dagen etter (24 timer) ble det registrert ytterligere 6 dødfisk: 2 fra V1- og 4 fra V2-gruppen. Ved uttaket etter 48 timer, ble det registrert 2 dødfisk: 1 fra V1- og 1 fra V2-gruppen. I tillegg ble det av røktere registrert 1 dødfisk fra V1-gruppen med utpreget finneråte (mulig dødsårsak) på dag 63. Det ble ikke registrert dødelighet for fisk som ble oppstallet i egne kar for uttak etter 1 og 4 timer, eller i gruppene for PBS- eller IP-fisk.

### 4.2 ELISA

For å sikre best mulig binding i brønnene, gjorde man et forsøk med coating av plater med enten US eller HC bakterieprøver. Erfaringer fra tidligere forsøk har vist at bakterieløsninger med US bakterieceller, gir bedre (jevne) binding i brønnene enn løsninger med HC bakterieceller (pers. med. Toni Erkinharju, januar 2016). Dette viste seg å stemme også for vårt forsøk der platene coatet med HC bakterieceller, viste lavere og mindre jevne målinger enn platene med US bakterieceller.

I enkelte tilfeller ble det registrert negative OD-verdier. Dette skyldes mest sannsynlig at de faktiske verdiene var for lave til å bli lest i spektrofotometeret. Disse resultatene ble registrert som 0 (ingen binding), og laveste verdi i grafene ble manuelt satt til 0. Negative OD-verdier presenteres altså ikke i resultatdelen av oppgaven.

I tillegg, for å gjøre de presenterte data mer oversiktlige og leservennlige, ble resultatene for brønner med fortykning 1:200, ikke presentert i oppgavens resultatkapittel. De høyeste resultatene fra OD-målingen kom utelukkende fra brønner med 1:100 fortykning, og de laveste verdiene fra brønner med 1:200 fortykning. Hensikten med brønnene med 1:200 fortykning, som kontroll for å avkrefte mettede brønner, er dermed oppfylt.

Resultatene for US-coatede plater er presentert fra og med delkapittel 4.2.1. Resultatene for HC-coatede plater, i tillegg til ikke-redigerte grafer med 1:200 fortykning for US-plater, finnes i appendiks IV.

De forskjellige plateoppsettene står også oppført i appendiks IV.

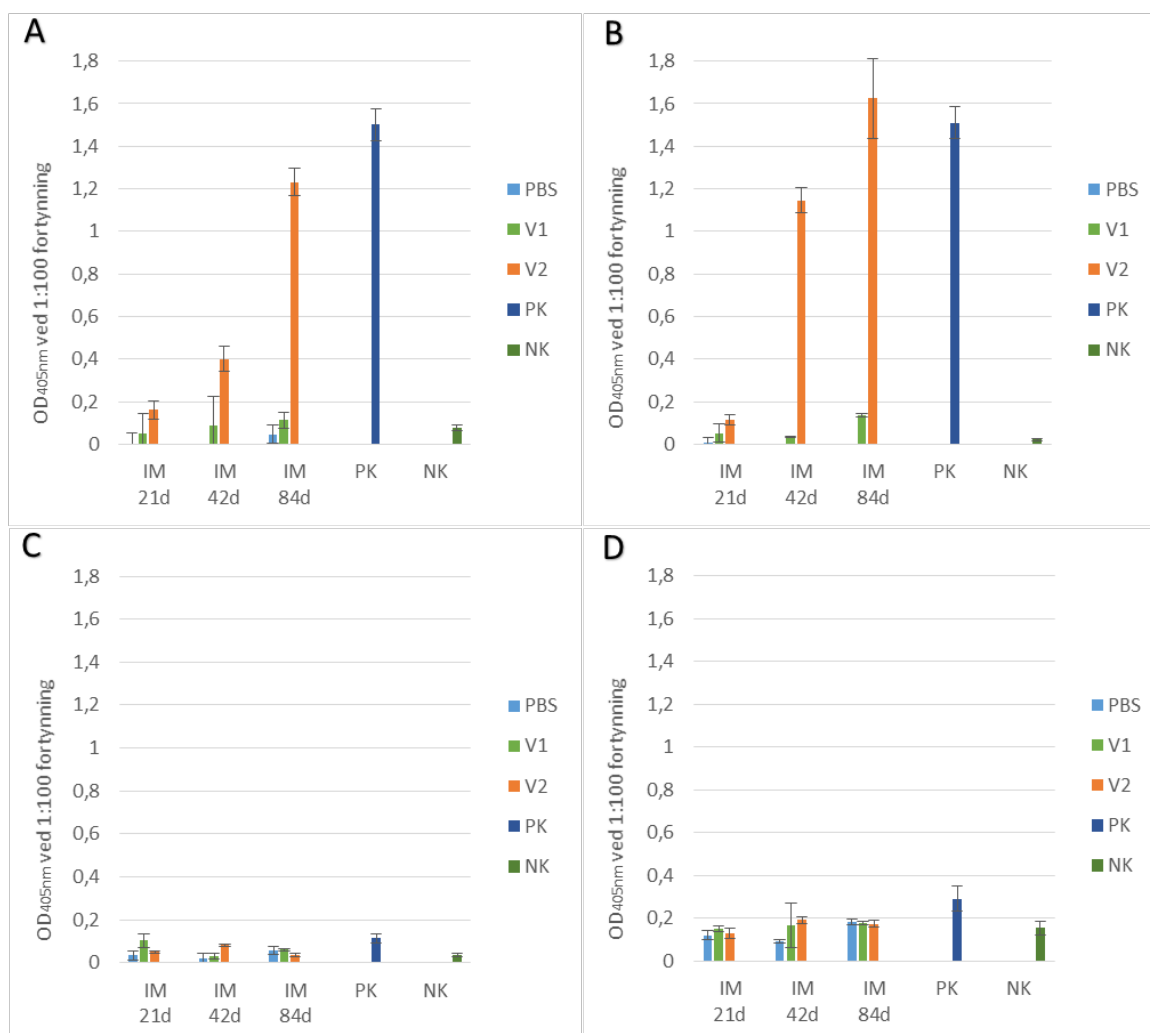


## 4.2.1 Antistoffrespons – serum-pools

## a) Antistoffrespons – plateoppsett 1: IM – V1 vs. V2

Oppsett 1 har fått serum fra IM-grupper: PBS, V1 og V2.

Figur 14 viser resultatene for serum-pools fra IM-fisk i Gr. 1. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner, med fortynning (1:100) av serum. Antall fisk (n) i uttakene varierte: dag 21 (n=10 for V1 og PBS, n=4 for V2), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=2 for V1, n=4 for V2, n=5 for PBS).



Figur 14. OD for: A. salmonicida gr. 5 (A) og gr. 6 (B), V. anguillarum O1 (C) og M. viscosa (D).

Serum-pools, plateoppsett 1: IM – V1 vs. V2. Antall fisk (n) i serum-pools fra uttakene varierte: dag 21 (n=10 for V1 og PBS, n=4 for V2), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=2 for V1, n=4 for V2, n=5 for PBS). Positiv kontroll (PK) og negativ kontroll (NK) er serum-pool fra IP-fisk (V1) i Gr. 2. ved dag 42. Resultatene presenteres som et gjennomsnitt av triplikate brønner ± standardavvik.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt ved dag 84. De høyeste verdiene ble observert for V2-grupper, mot *A. salmonicida* gr. 5 og 6. Det ble målt en noe høyere respons for V2-gruppen mot *A. salmonicida* gr. 6 (1,62) enn for gr. 5 (1,23), og differansen i OD-verdi var på henholdsvis 1,49 og 1,12 mot V1-gruppene på de to platene.

For plater med *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa*, ble det til sammenligning kun registrert OD-verdier under 0,2.

For platen med *V. anguillarum* O1, ble høyeste OD-verdi (0,08) målt for V2-gruppen ved dag 42, mot høyeste OD-verdi for V1-gruppen (0,06) ved dag 84.

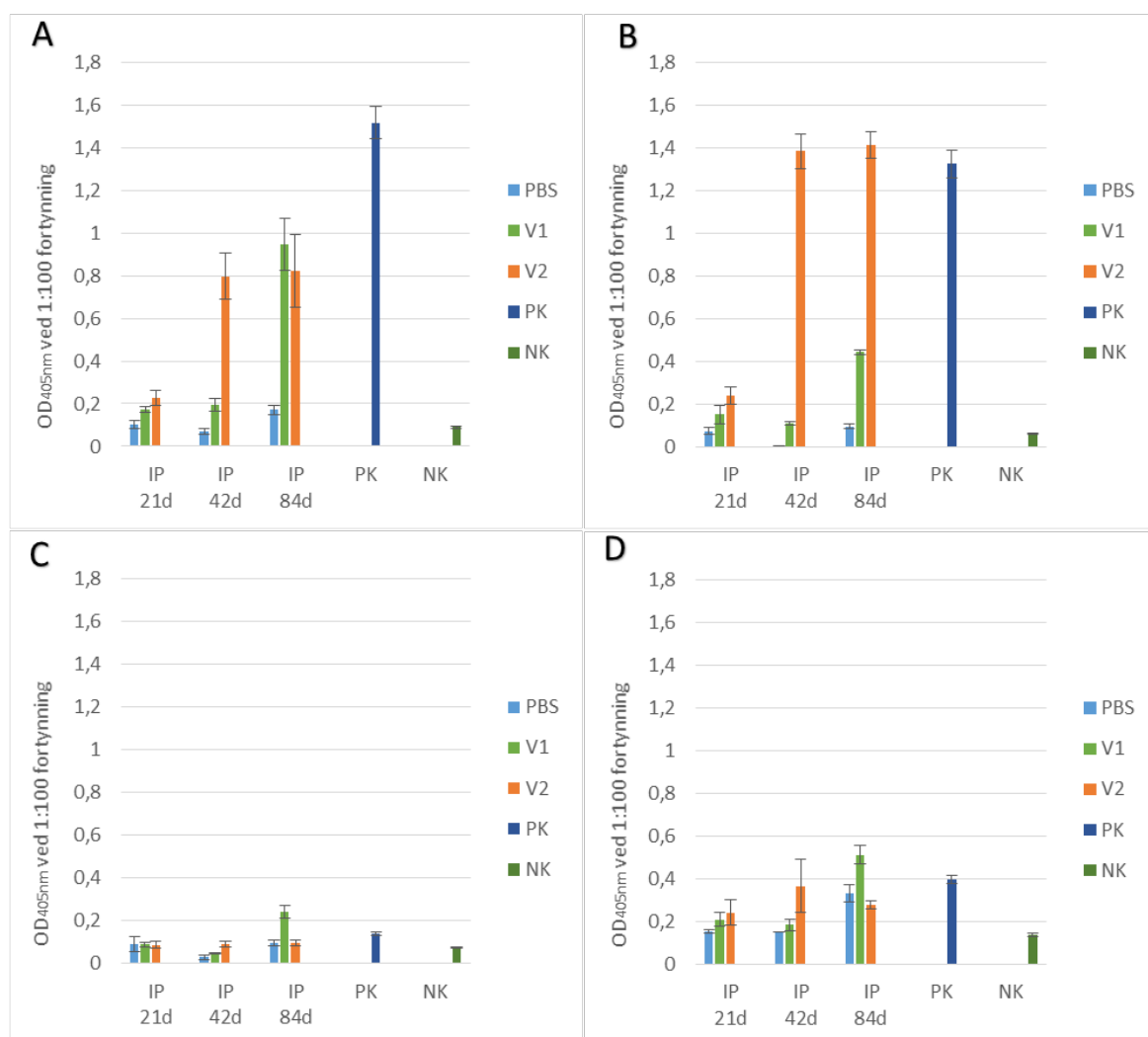
For platen med *M. viscosa* ble høyeste OD-verdi (0,19) målt for V2-gruppen ved dag 42, med en differanse på 0,1 mot høyeste verdi målt for V1-gruppen (0,18) ved dag 84. PBS-fisk ble til sammenligning målt til en OD-verdi på 0,18 ved dag 84.

Resultatene ble presentert som et gjennomsnitt av triplikate brønner  $\pm$  standardavvik. Videre statistiske analyser for gruppeforskjeller ble ikke gjennomført for resultatene fra serum-pools, grunnet manglende oversikt over individ-data.

b) Antistoffrespons – plateoppsett 2: IP – V1 vs. V2

Oppsett 2 har fått serum fra IP-grupper: PBS, V1 og V2.

Figur 15 viser resultatene for serum-pools fra IP-fisk i Gr. 1. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner med fortyning (1:100) av serum. Antall fisk (n) i uttakene varierte: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10), dag 84 (n=5).



Figur 15. OD for: *A. salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), *V. anguillarum* O1 (C) og *M. viscosa* (D).

Serum-pools, plateoppsett 2: IP - V1 vs. V2.

Antall fisk (n) i serum-pools fra uttakene varierte: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=5).

Positiv kontroll (PK) og negativ kontroll (NK) er serum-pool fra IP-fisk (V1) i Gr. 2. ved dag 42.

Resultatene presenteres som et gjennomsnitt av triplikate brønner ± standardavvik.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt ved dag 84. Høyeste verdi (1,41) ble observert for V2-gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 6. Differansen i OD-verdi var på ca. 0,97 mot høyeste verdi (0,44) for V1-gruppen på samme plate. For platen med *A. salmonicida* gr. 5, ble høyeste OD-verdi (0,94) observert hos V1-gruppen ved 84 dager, med en differanse i OD-verdi på ca. 0,12 mot høyeste verdi (0,82) målt for V2-gruppen på samme plate.

For platen coatet med *V. anguillarum* O1, ble høyeste OD-verdi (0,24) målt for V1-gruppen ved dag 84. Differansen var på 0,15 mot høyeste OD-verdi (0,9) målt for V2-gruppen ved dag 42.

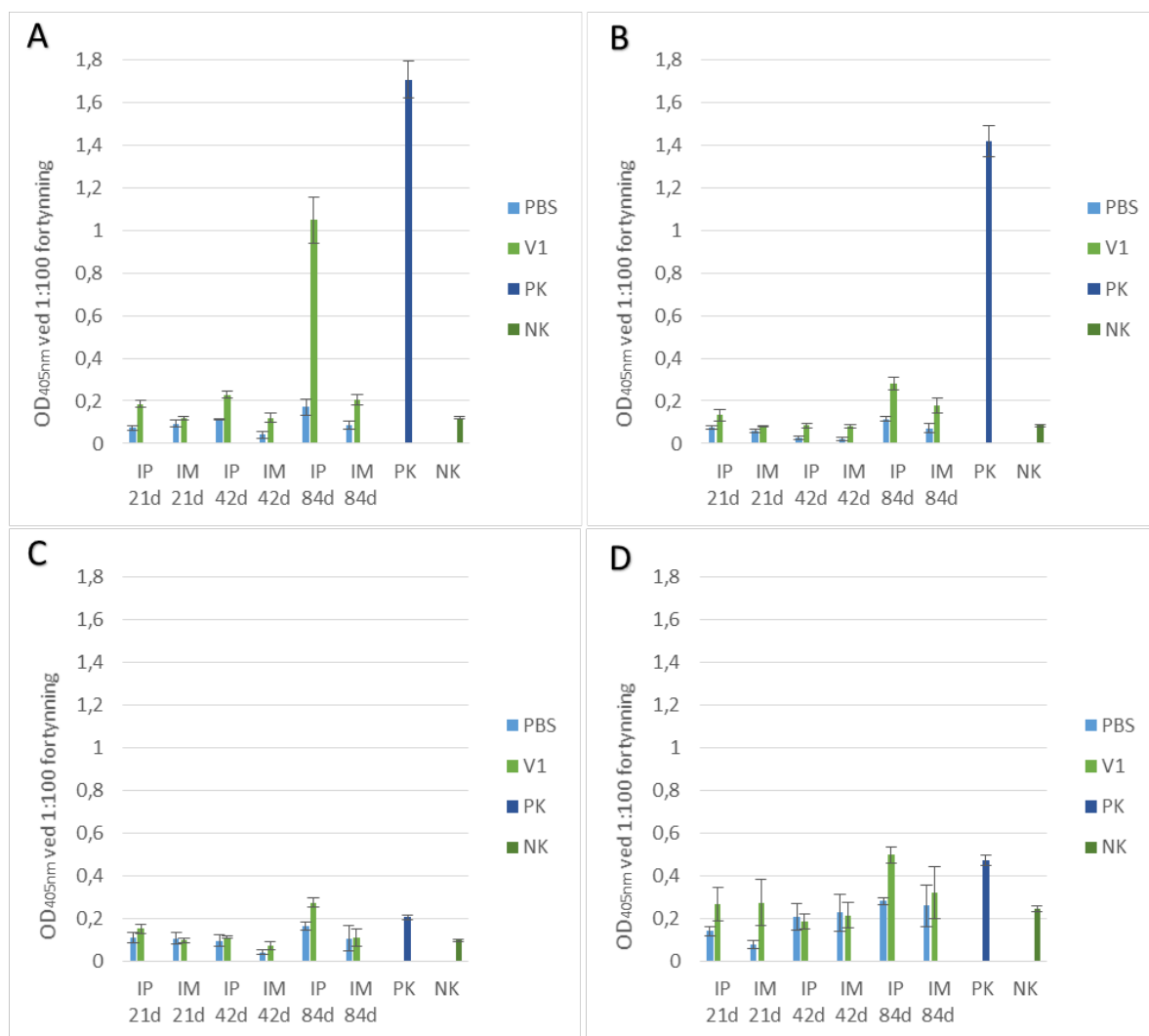
For platen coatet med *M. viscosa*, ble høyeste OD-verdi (0,51) målt for V1-gruppen ved dag 84. Differansen var på 0,14 mot høyeste OD-verdi (0,37) målt for V2-gruppen ved dag 42.

Resultatene ble presentert som et gjennomsnitt av triplikate brønner  $\pm$  standardavvik. Videre statistiske analyser for gruppeforskjeller ble ikke gjennomført for resultatene fra serum-pools, grunnet manglende oversikt over individ-data.

c) Antistoffrespons – plateoppsett 3: V1 – IM vs. IP

Oppsett 3 har fått serum fra IM- og IP-grupper: PBS og V1.

Figur 16 viser resultatene for serum-pools fra IM- og IP-fisk (PBS og V1) i Gr. 1. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner med fortyning (1:100) av serum. Antall fisk (n) i uttakene varierte. For IM-grupper: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=2 for V1 og n=5 for PBS). For IP-grupper: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10), dag 84 (n=5).



Figur 16. OD for: *A. salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), *V. anguillarum* O1 (C) og *M. viscosa* (D).

**Serum-pools, plateoppsett 3: V1 - IM vs. IP.** Antall fisk (n) i serum-pools fra uttakene varierte. For IM-grupper: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=2 for V1 og n=5 for PBS). For IP-grupper: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10), dag 84 (n=5). Positiv kontroll (PK) og negativ kontroll (NK) er serum-pool fra IP-fisk (V1) i Gr. 2. ved dag 42. Resultatene presenteres som et gjennomsnitt av triplikate brønner ± standardavvik.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt ved dag 84. Høyeste verdi (1,05) ble observert for vaksinert fisk i IP-gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 5. Differansen i OD-verdi var på ca. 0,84 mot høyeste verdi (0,21) for vaksinert fisk i IM-gruppen på samme plate.

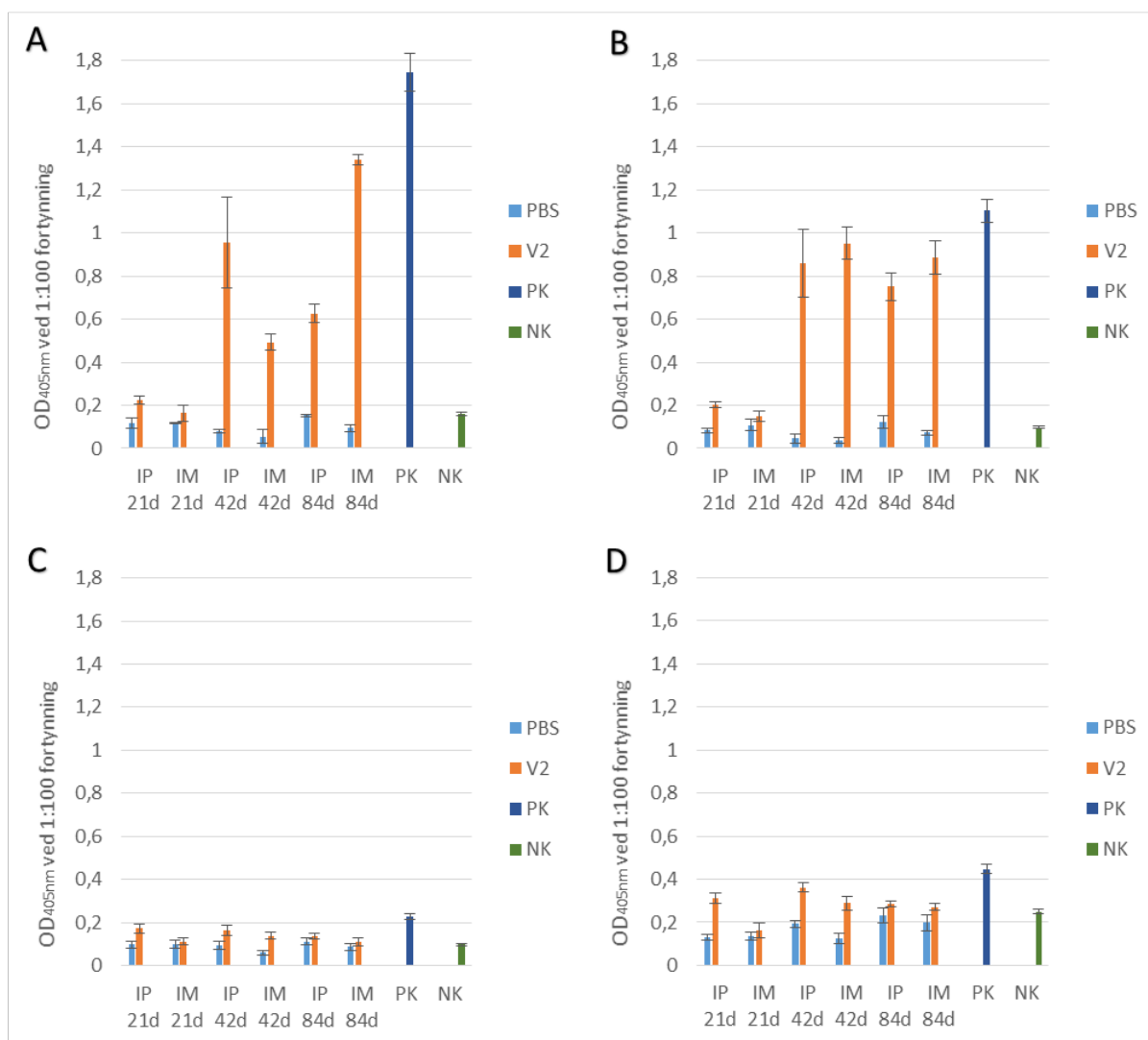
Høyeste verdi finner man også for vaksinert IP-gruppe ved dag 84 for platene med *A. salmonicida* gr. 6 (0,28), *V. anguillarum* O1 (0,27) og *M. viscosa* (0,5). Differansen i OD-verdi mellom IP- og IM-gruppen var da på henholdsvis 0,1, 0,16 og 0,18.

Resultatene ble presentert som et gjennomsnitt av triplikate brønner  $\pm$  standardavvik. Videre statistiske analyser for gruppeforskjeller ble ikke gjennomført for resultatene fra serum-pools, grunnet manglende oversikt over individ-data.

## d) Antistoffrespons – plateoppsett 4: V2 – IM vs. IP

Oppsett 4 har fått serum fra IM- og IP-grupper: PBS og V2.

Figur 17 viser resultatene for serum-pools fra IM- og IP-fisk (PBS og V2) i Gr. 1. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner med fortykning (1:100) av serum. Antall fisk (n) i uttakene varierte. For IM-grupper: dag 21 (n=10 for PBS og n=4 for V2), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=4 for V2 og n=5 for PBS). For IP-grupper: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10), dag 84 (n=5).



Figur 17. OD for: A. *salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), V. *anguillarum* O1 (C) og M. *viscosa* (D).

**Serum-pools, plateoppsett 4: V2 - IM vs. IP.** Antall fisk (n) i serum-pools fra uttakene varierte.

For IM-grupper: dag 21 (n=10 for PBS og n=4 for V2), dag 42 (n=10) og dag 84 (n=4 for V2, n=5 for PBS).

For IP-grupper: dag 21 (n=10), dag 42 (n=10), dag 84 (n=5).

Positiv kontroll (PK) og negativ kontroll (NK) er serum-pool fra IP-fisk (V1) i Gr. 2. ved dag 42.

Resultatene presenteres som et gjennomsnitt av triplikate brønner ± standardavvik.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt ved dag 84. Høyeste verdi (1,34) ble målt for vaksinert fisk i IM-gruppen ved dag 84, mot *A. salmonicida* gr. 5. Differansen i OD-verdi var på 0,39 mot høyeste verdi (0,95) for IP-gruppen, målt ved dag 42.

For platen med *A. salmonicida* gr. 6, ble høyeste OD-verdi (0,95) målt for IM-fisk ved dag 42, med en differanse på 0,09 mot høyeste OD-verdi (0,86) målt for IP-fisk fra samme uttak.

Høyeste OD-verdi for platene med *V. anguillarum* O1 (0,16) og *M. viscosa* (0,36) ble målt for IP-grupper ved dag 42, med en differanse i OD-verdi på henholdsvis 0,07 og 0,02 mot de høyeste verdiene for IM-grupper mot *V. anguillarum* O1 (0,14) og *M. viscosa* (0,29). Samtlige OD-verdier for de forskjellige gruppene ble målt til under 0,4 for disse platene.

Resultatene ble presentert som et gjennomsnitt av triplikate brønner  $\pm$  standardavvik. Videre statistiske analyser for gruppeforskjeller ble ikke gjennomført for resultatene fra serum-pools, grunnet manglende oversikt over individ-data.



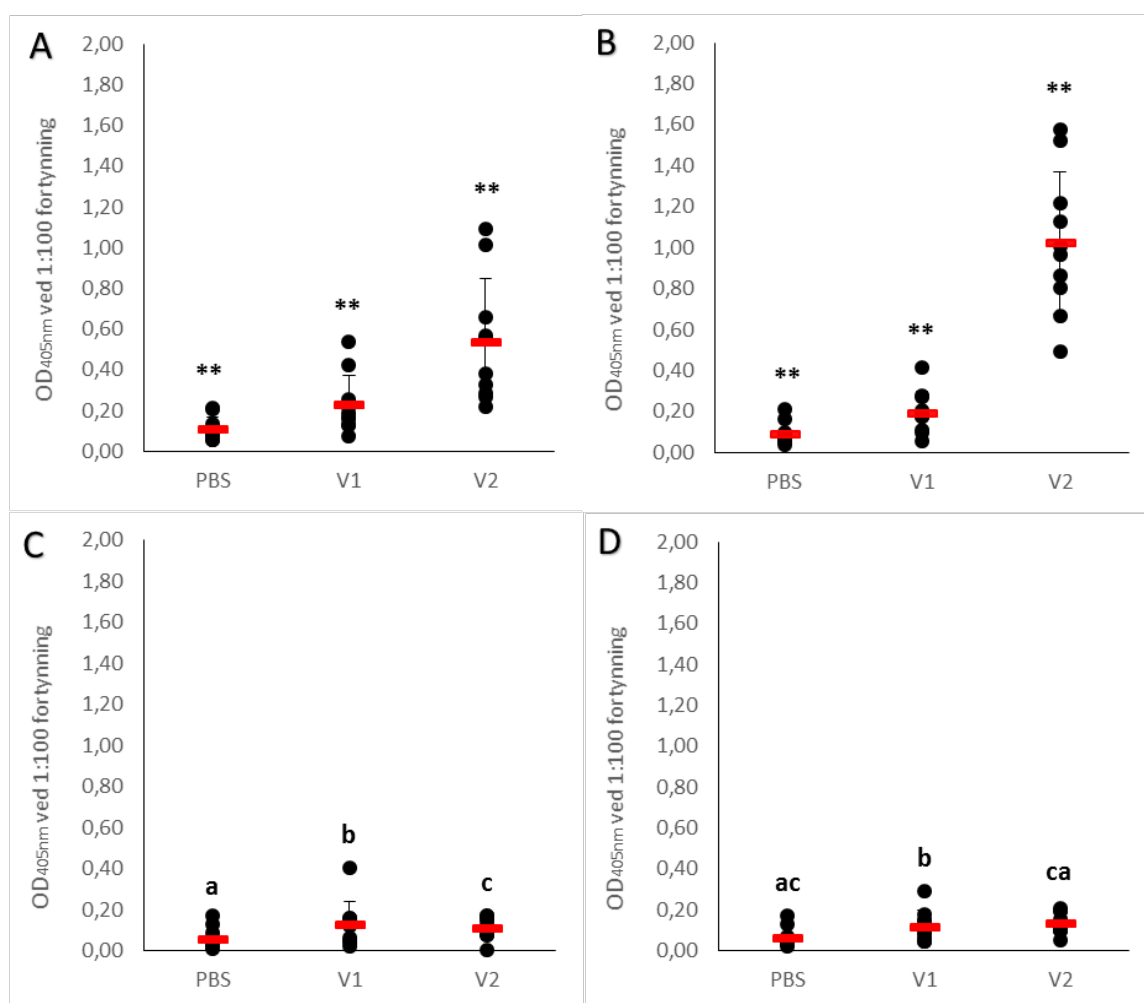
#### 4.2.2 Antistoffrespons – individserum fra dag 42

Det ble gjennomført ELISA på individnivå, for å undersøke variasjon i antistoffrespons for ulike fisk fra de forskjellige gruppene. Prøver fra dag 42 ble valgt, da disse ga det beste grunnlaget for statistiske sammenligninger. PK ble også tillaget for samtlige plater (se metode på side 27), men resultatene fra disse ble ikke vist i grafene.

##### a) Antistoffrespons – plateoppsett 1: IM – V1 vs. V2

Oppsett 1 har fått serum fra IM-grupper: PBS, V1 og V2.

Figur 18 viser resultatene for individ-serum fra IM-fisk i Gr. 1, ved dag 42. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner, med fortykning (1:100) av serum. Antall fisk (n) er lik for alle gruppene (n=10).



Figur 18. OD for: *A. salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), *V. anguillarum* O1 (C) og *M. viscosa* (D).

**Individ-serum, plateoppsett 1: IM – V1 vs. V2.** Antall fisk (n) er lik 10.

Resultater fra individ-serum i triplikate brønner, med gjennomsnitt (rød strek) ± standardavvik.

Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a, b, c) og tegn (\*\*) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt for vaksinerte grupper.

Høyeste verdi (1,58) ble målt for V2-gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 6. Differansen var på 1,17 mot høyeste verdi (0,41) for V1-gruppen fra den samme platen. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom samtlige fiskegrupper for denne platen.

Nest høyeste verdi (1,09) ble målt for V2- gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 5. Differansen var på 0,55 mot høyeste verdi (0,54) for V1-gruppen fra den samme platen. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom samtlige fiskegrupper for denne platen.

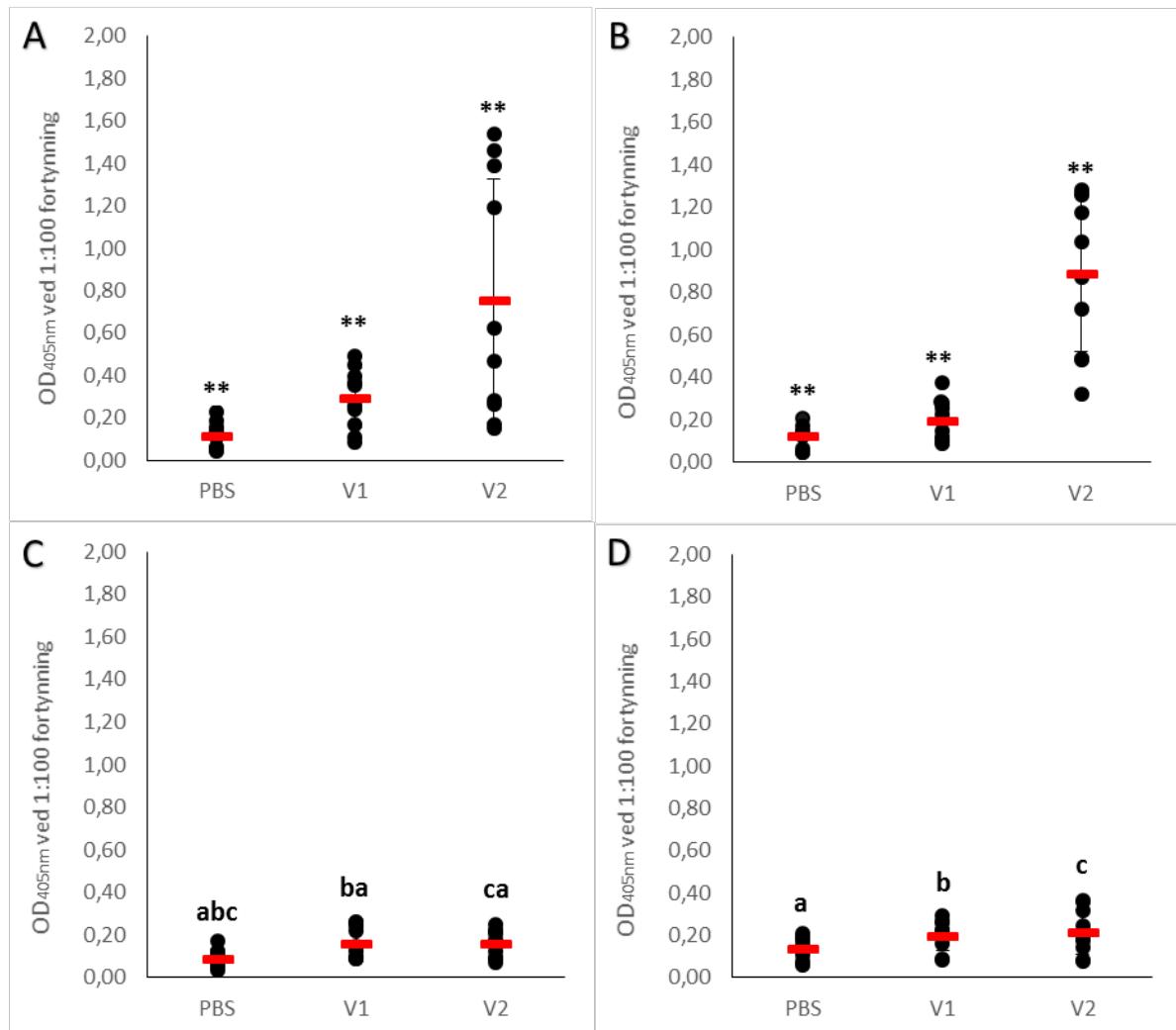
For platen coatet med *V. anguillarum* O1 ble høyeste verdi (0,40) målt for V1-gruppen. Differansen var på 0,23 mot de to nest høyeste verdiene (0,17), for V2- og PBS-gruppen på samme plate. Statistiske analyser bekrefter ikke signifikante forskjeller mellom noen av fiskegruppene for denne platen.

For platen coatet med *M. viscosa*, ble høyeste verdi (0,29) målt for V1-gruppen. Differansen var på 0,08 mot høyeste verdi (0,21) for V2-gruppen på samme plate. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom PBS- og V2-gruppen for denne platen.

b) Antistoffrespons - plateoppsett 2: IP – V1 vs. V2

Oppsett 2 har fått serum fra IP-grupper: PBS, V1 og V2.

Figur 19 viser resultatene for individ-serum fra IP-fisk i Gr. 1, ved 42 dager. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner, med fortynning (1:100) av serum. Antall fisk (n) er lik for alle gruppene (n=10).



Figur 19. OD for: *A. salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), *V. anguillarum* O1 (C) og *M. viscosa* (D).

Individ-serum, plateoppsett 2: IP – V1 vs. V2. Antall fisk (n) er lik 10.

Resultater fra individ-serum i triplikate brønner, med gjennomsnitt (rød strek) ± standardavvik.

Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a, b, c) og tegn (\*\*) indikerer signifikante ( $p < 0,05$ ) gruppeforskjeller.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt for vaksinerte grupper.

Høyeste verdi (1,54) ble målt for V2-gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 5. Differansen var på 1,05 mot høyeste verdi (0,49) for V1-gruppen fra den samme platen. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom samtlige fiskegrupper for denne platen.

Nest høyeste verdi (1,28) ble målt for V2- gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 6. Differansen var på 0,9 mot høyeste verdi (0,38) for V1-gruppen fra den samme platen. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom samtlige fiskegrupper for denne platen.

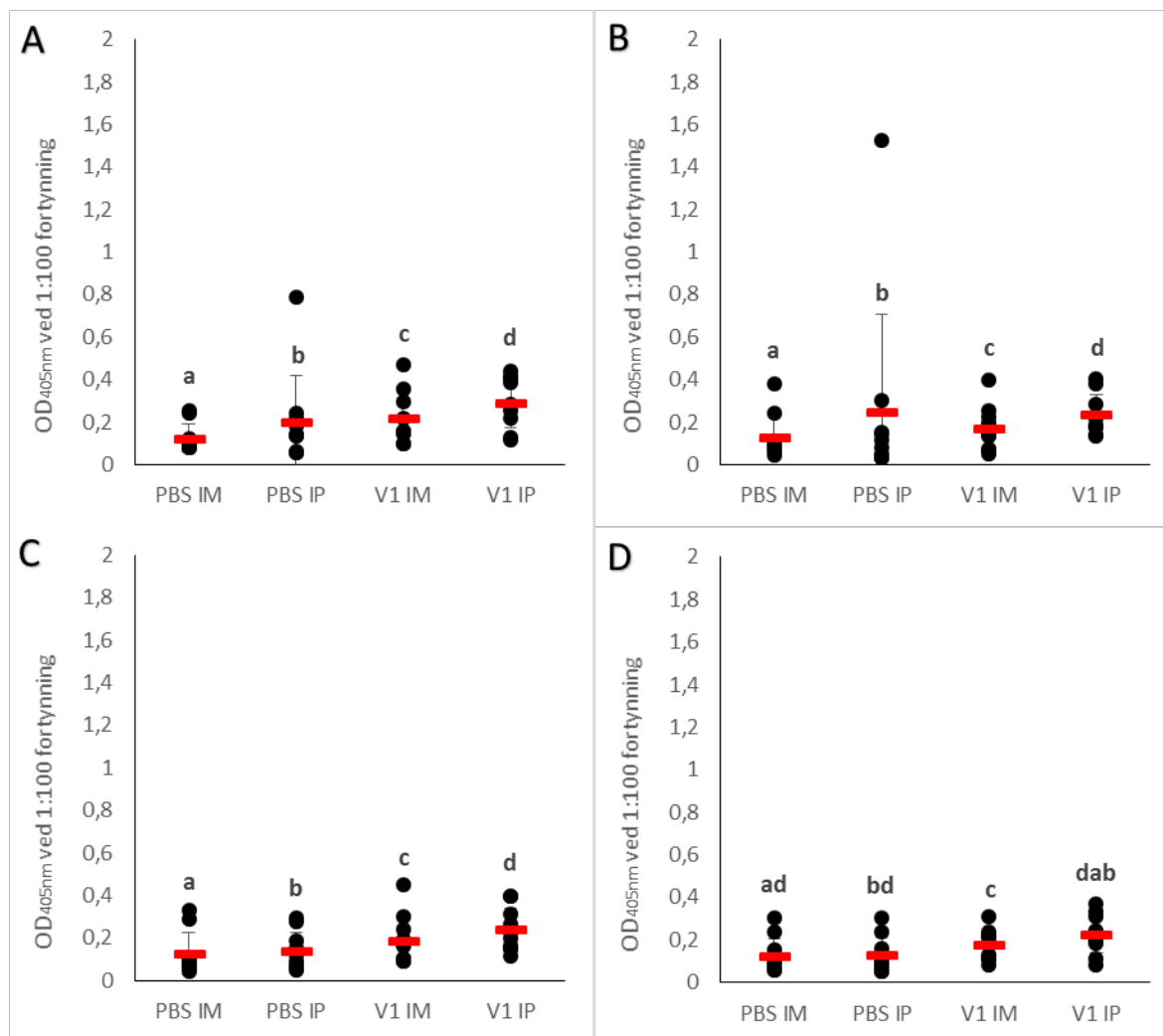
For platen coatet med *V. anguillarum* O1 ble høyeste verdi (0,26) målt for V1-gruppen. Differansen var på 0,01 mot høyeste verdi (0,25) for V2-gruppen på samme plate. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom vaksinerte fiskegrupper og PBS-gruppen, men ikke mellom de vaksinerte gruppene.

For platen coatet med *M. viscosa* ble høyeste verdi (0,36) målt for V2-gruppen. Differansen var på 0,07 mot høyeste verdi (0,29) for V1-gruppen på samme plate. Statistiske analyser bekrefter ikke signifikante forskjeller mellom fiskegruppene for denne platen.

c) Antistoffrespons - plateoppsett 3: V1 – IM vs. IP

Oppsett 3 har fått serum fra IM- og IP-grupper: PBS og V1.

Figur 20 viser resultatene for individ-serum fra IP-fisk i Gr. 1, ved 42 dager. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner, med fortynning (1:100) av serum. Antall fisk (n) er lik for alle gruppene (n=10).



Figur 20. OD for: *A. salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), *V. anguillarum* O1 (C) og *M. viscosa* (D).

Individ-serum, plateoppsett 3: V1 – IM vs. IP. Antall fisk (n) er lik 10.

Resultater fra individ-serum i triplikate brønner, med gjennomsnitt (rød strek) ± standardavvik.

Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a, b, c) indikerer signifikante (p < 0,05) gruppeforskjeller.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt for PBS-grupper.

Høyeste verdi (1,52) ble målt for en enkelt PBS-fisk i IP-gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 6. Nest høyeste verdi (0,78) ble også målt for en PBS-fisk fra IP-gruppen, mot *A. salmonicida* gr. 5.

Samtlige andre verdier, for alle agens, ble målt til lavere verdier enn 0,5.

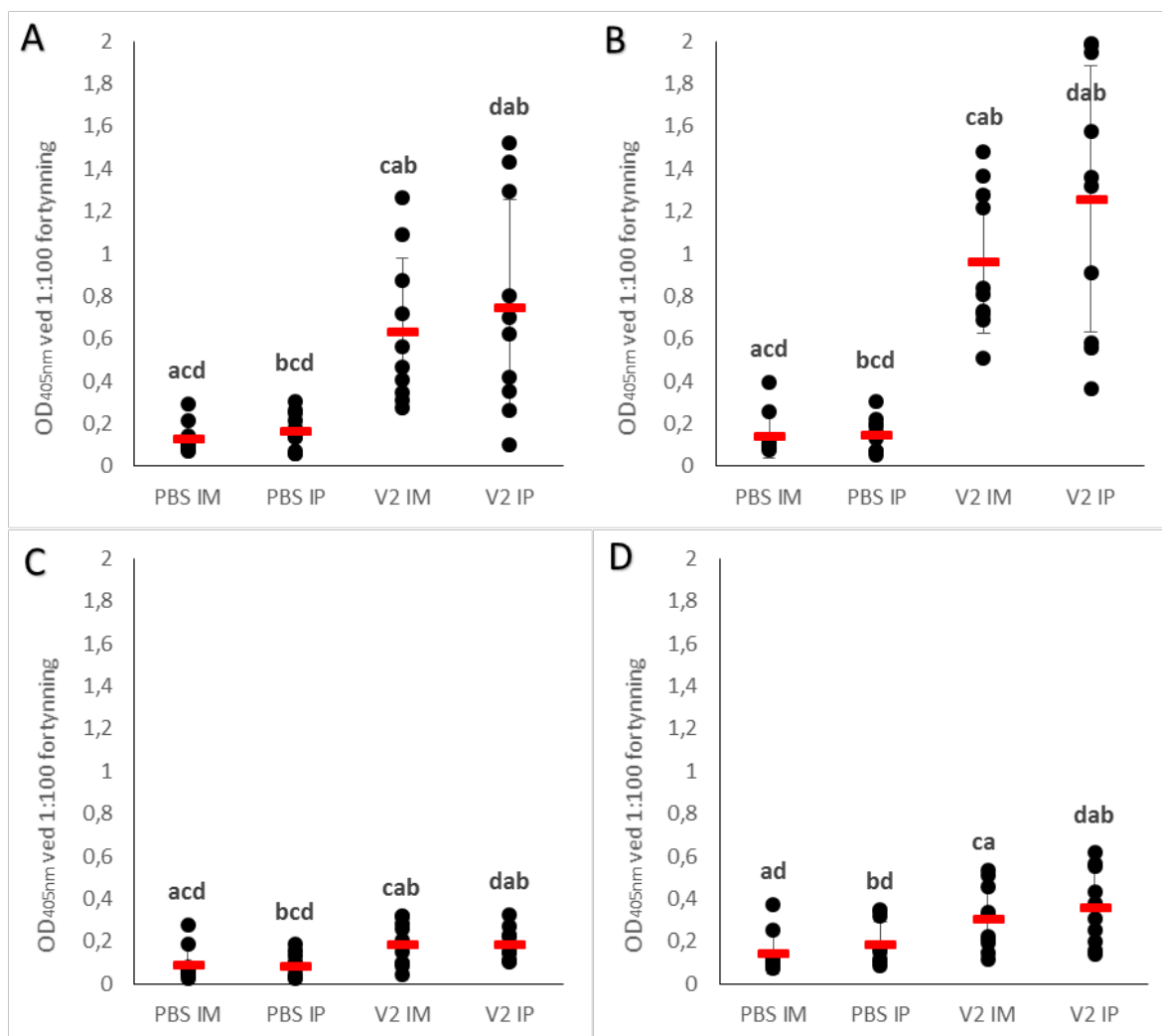
Statistiske analyser bekrefter ikke signifikante forskjeller mellom noen av fiskegruppene for platen coatet med *V. anguillarum* O1.

For platen coatet med *M. viscosa*, viste statistiske analyser signifikante forskjeller mellom PBS-gruppene og vaksinert IP-fisk, men ikke for vaksinert IM-fisk.

d) Antistoffrespons - plateoppsett 4: V2 – IM vs. IP

Oppsett 4 har fått serum fra IM- og IP-grupper: PBS og V2.

Figur 21 viser resultatene for individ-serum fra IP-fisk i Gr. 1, ved 42 dager. Hvert diagram i figuren viser resultatene fra en plate, og er basert på gjennomsnittsverdier fra triplikate brønner, med fortykning (1:100) av serum. Antall fisk (n) er lik for alle gruppene (n=10).



Figur 21. OD for: *A. salmonicida* gr. 5 (A) og gr. 6 (B), *V. anguillarum* O1 (C) og *M. viscosa* (D).

Individ-serum, plateoppsett 4: V2 – IM vs. IP. Antall fisk (n) er lik 10.

Resultater fra individ-serum i triplikate brønner, med gjennomsnitt (rød strek) ± standardavvik.

Kombinasjonen av forskjellige bokstaver (a, b, c) indikerer signifikante (p < 0,05) gruppeforskjeller.

Resultatene viste høyest OD-verdi målt for vaksinerte grupper.

Høyeste verdi (1,99) ble målt for vaksinert IP-fisk, mot *A. salmonicida* gr. 6. Differansen var på 0,51 mot høyeste verdi (1,48) for vaksinert IM-fisk på den samme platen. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom vaksinerte fiskegrupper og PBS-gruppene for denne platen, men ikke mellom vaksinerte grupper.

Nest høyeste verdi (1,52) ble målt for vaksinert IP-fisk, mot *A. salmonicida* gr. 5. Differansen var på 0,26 mot høyeste verdi (1,26) for vaksinert IM-fisk på den samme platen. Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom samtlige fiskegrupper for denne platen.

Samtlige verdier for plater coatet med *V. anguillarum* og *M. viscosa* ble målt til lavere verdier enn 0,6.

Statistiske analyser bekrefter signifikante forskjeller mellom vaksinerte grupper og PBS-gruppene for platen coatet med *V. anguillarum* O1, men ikke mellom vaksinerte grupper.

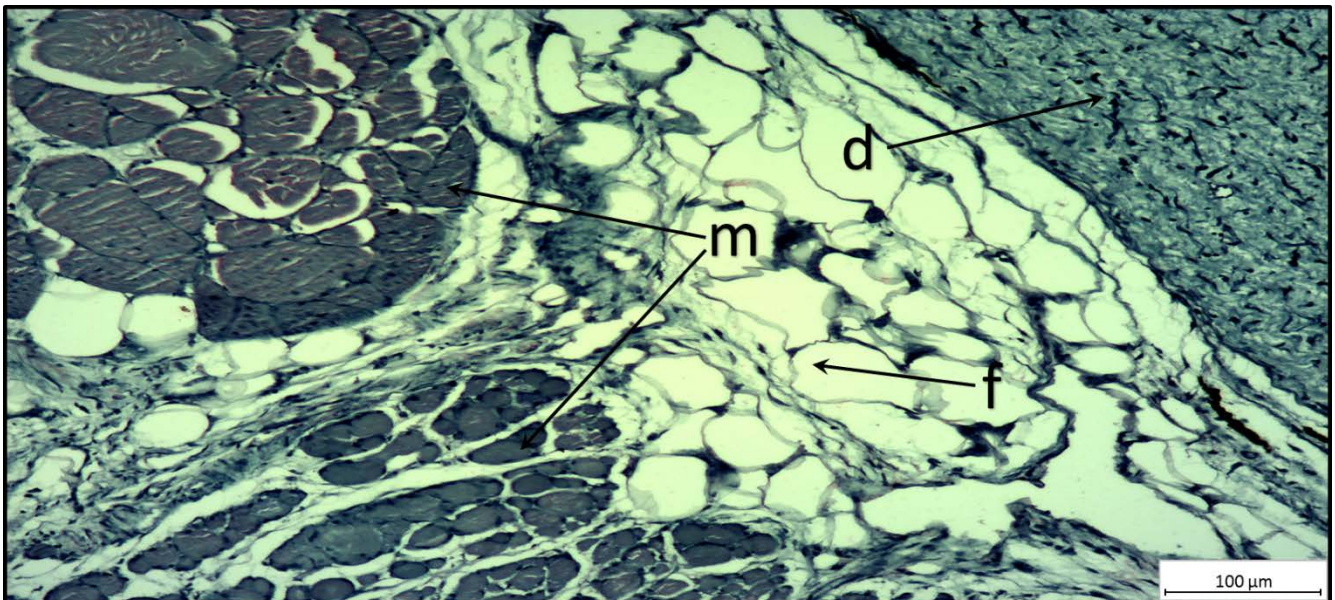
For platen coatet med *M. viscosa*, viste statistiske analyser signifikante forskjeller mellom vaksinerte IP-fisk og PBS-gruppene, men ikke mellom vaksinerte grupper. Det ble videre påvist signifikante forskjeller mellom vaksinert IM-fisk og uvaksinert IM-fisk (PBS), men ikke mellom vaksinert IM-fisk og uvaksinert IP-fisk (PBS).



### 4.3 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi ble benyttet for å detektere vaksinerester i histologiske snitt. Tverrsnitt av muskelceller fra ikke-immunisert IM-fisk fra uttaket ved dag 0, samt fra immunisert fisk fra uttakene ved dag 21 og 42, ble undersøkt. Tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1 (rød farge) ble benyttet som en indikator på vaksinerester.

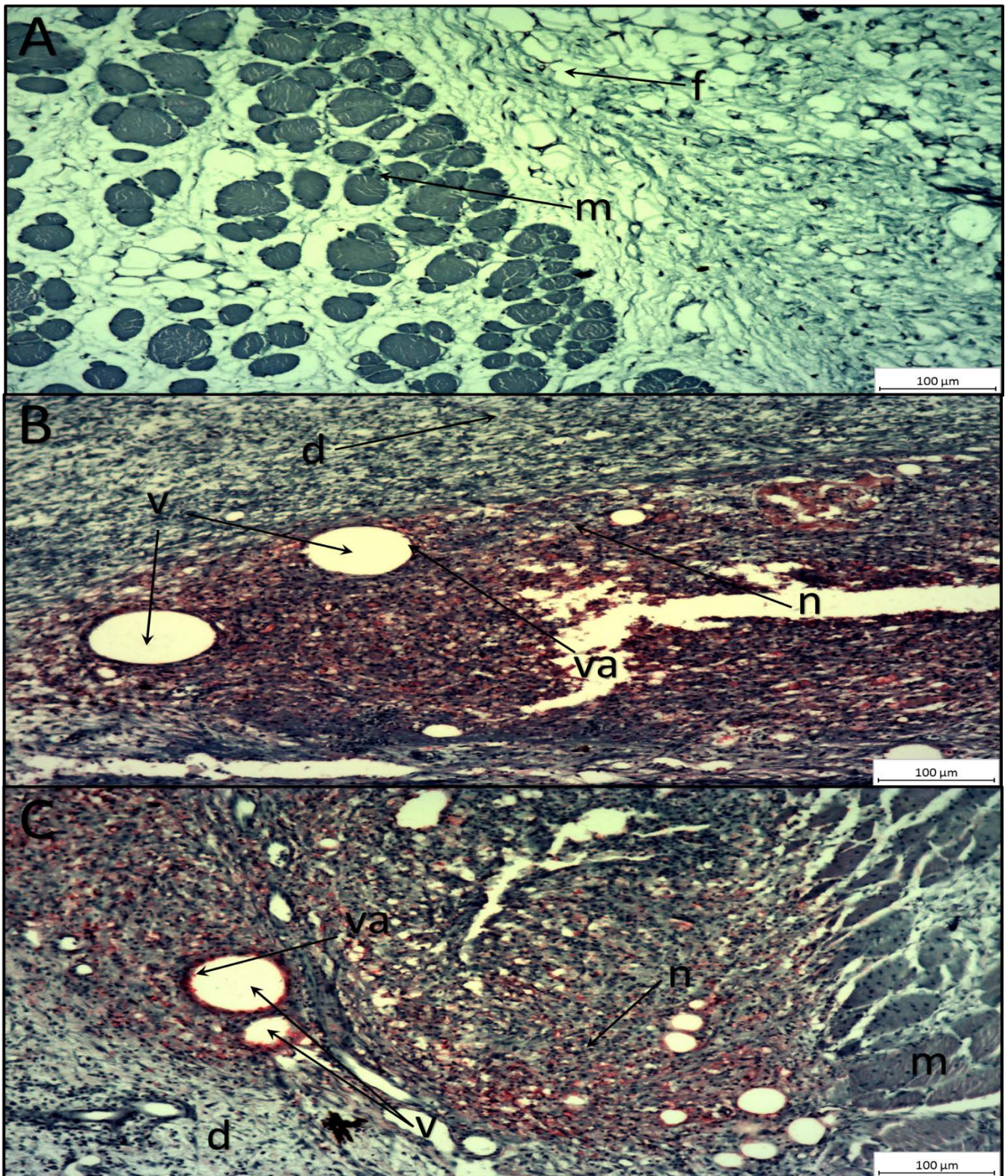
Det ble ikke detektert vaksinerester, eller tilsvarende fargeforandringer (uspesifikk binding), for fisk fra dag 0 eller PBS-fisk fra dag 21 eller dag 42. Figur 22 viser normalhistologi for ikke-immunisert fisk ved dag 0.



Figur 22. Normalhistologi for ikke-immunisert fisk ved dag 0.

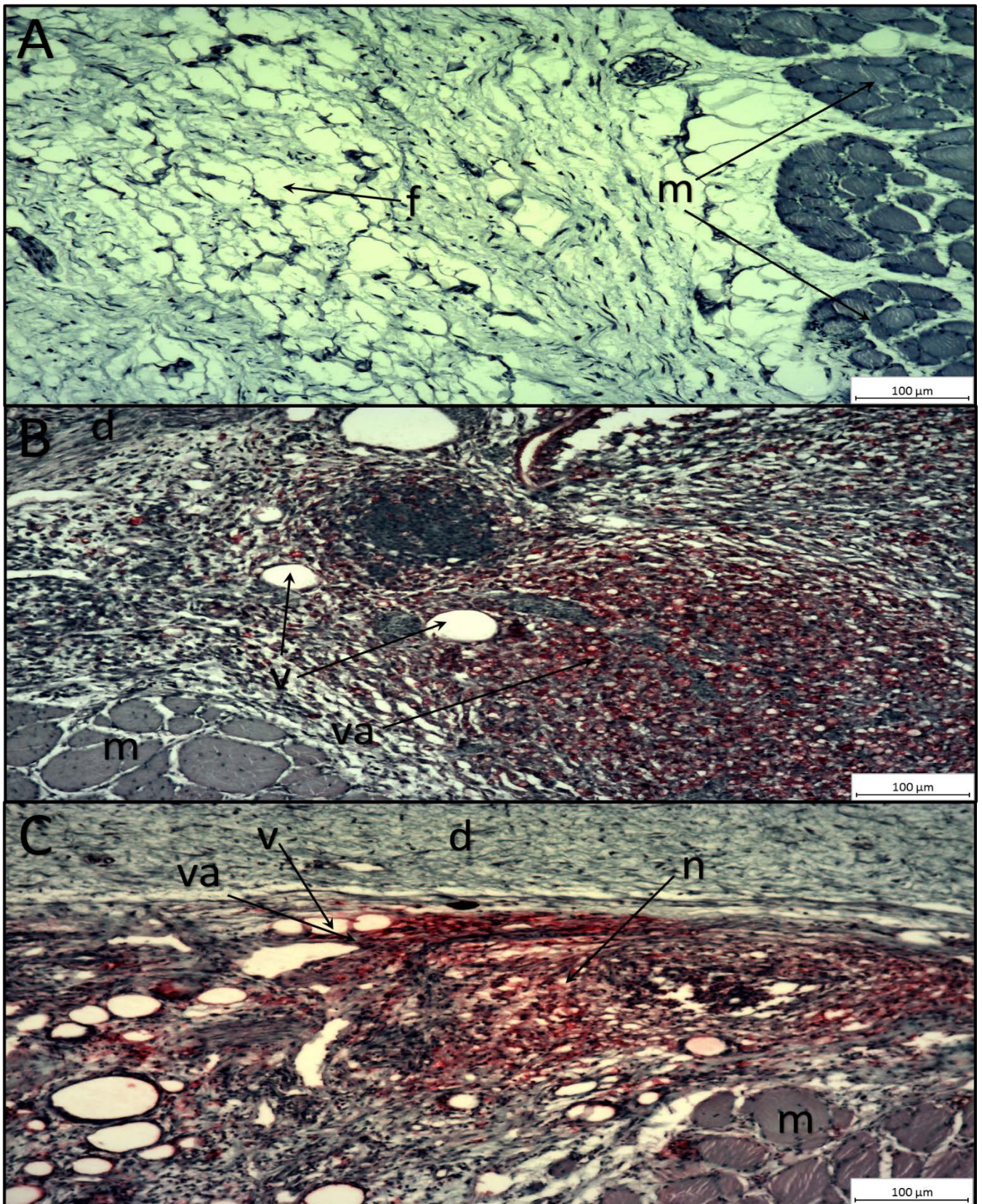
Bildet viser overgangen mellom dermis (d) og skjelettmuskulatur (m), med mellomliggende lag av fettceller og bindevev (f). Målestokken tilsvarer 100 μm, og bildet ble tatt ved 10 x forstørrelse.

*V. anguillarum* O1 ble detektert for vaksinerte fiskegrupper (V1 og V2) for samtlige undersøkte prøver fra uttak på dag 21 og dag 42. Resultatene er presentert i figur 23 og 24.



Figur 23. Resultater fra immunisert fisk ved dag 21: PBS (A), V1 (B) og V2 (C).

Bildene viser overgangen mellom dermis (d) og skjelettmuskulatur (m), med mellomliggende lag av fettceller og bindevev (f). For vaksinert fisk vises innkapslede vaksinedråper (v) med tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1 (va), omringet av nekrotisk vev (n). Målestokken tilsvarer 100 µm, og bildene ble tatt ved 10 x forstørrelse.



**Figur 24. Resultater fra immunisert fisk ved dag 42: PBS (A), V1 (B) og V2 (C).**

Bildene viser overgangen mellom dermis (d) og skjelettmuskulatur (m), med mellomliggende lag av fettceller og bindevev (f). For vaksinert fisk vises innkapslede vaksinedråper (v) med tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1 (va), omringet av nekrotisk vev (n). Målestokken tilsvarer 100 µm, og bildene er tatt ved 10 x forstørrelse.

### 4.4 Histologi

Histologiske undersøkelser ble gjennomført med den hensikt å påvise eventuelle negative innvirkninger av vaksinerings hos IM-fisk. Forskjellige grader av inflammasjon i vevet, ble benyttet som indikator på negativ innvirkning.

For å begrense arbeidsmengden til et nivå som var mulig å gjennomføre innenfor forsøkets tidsrammer, valgte man å halvere antall undersøkte PBS-fisk fra hvert prøveuttak (fra 4 til 2 fisk). Samtidig valgte man også å ikke evaluere fisk fra uttakene ved dag 14 og dag 28, da det kun ble tatt ut fisk fra V1- og PBS-gruppene på dette tidspunktet. Det totale antallet undersøkte snitt (3 fra hver fisk) ble da på 267. Av disse stammet 54 snitt fra PBS-fisk, mens 96 snitt ble undersøkt fra hver av de to vaksinerte gruppene.

Snittene ble i første omgang analysert i mikroskop, med original merking, av forsøksperson 1. Det ble lagt fokus på å detektere tilstedeværelse (+) eller ikke tilstedeværelse (-) av inflammasjon i vevet. Snittene ble deretter blindet, og gitt et individnummer fra 1-267. Deretter ble snittene analysert av forsøksperson 2 og 3, og gradert tilsvarende, med fokus på tilstedeværelse (+) eller ikke tilstedeværelse (-) av inflammasjon. Blindtesten ble gjennomført for å eliminere subjektiv innflytelse ved analysering.

Resultatene er presentert som gjennomsnittsverdier i tabell 17, og individuelle resultater står oppført i appendiks V.

## Resultater

**Tabell 17. Resultater fra histologiske analyser (gjennomsnittsverdier).**

Prøver fra dag 0 regnes inn under PBS. Antall fisk (n), med totalt 3 snitt, som ble undersøkt fra gruppene var: PBS (n=2), V1 og V2 (n=4).

Evaluering foretatt av:									
Uttak	Forsøksperson 1			Forsøksperson 2			Forsøksperson 3		
	PBS	V1	V2	PBS	V1	V2	PBS	V1	V2
Dag 0 (uvaks.)	1/6			1/6			1/6		
1t	0/6	0/12	0/12	0/6	0/12	0/12	0/6	0/12	0/12
4t	0/6	0/12	0/12	0/6	3/12	0/12	0/6	0/12	0/12
24t	0/6	0/12	0/12	0/6	1/12	1/12	0/6	1/12	0/12
48t	0/6	7/12	7/12	0/6	3/12	5/12	0/6	5/12	5/12
4d	0/6	12/12	10/12	1/6	9/12	6/12	0/6	8/12	4/12
7d	1/6	11/12	11/12	1/6	7/12	12/12	1/6	4/12	9/12
14d	Ikke evaluert (manglende uttak fra V2-gruppen)								
21d	0/6	12/12	12/12	0/6	7/12	10/12	0/6	7/12	7/12
28d	Ikke evaluert (manglende uttak fra V2-gruppen)								
42d	6/6	12/12	12/12	0/6	8/12	7/12	0/6	5/12	6/12
Sum	8/54	54/96	52/96	3/54	38/96	41/96	2/54	30/96	31/96

Resultatene viste lavt tilstedeværelse av inflammasjon i prøver fra PBS-fisk, med  $\leq 8$  positive (+) påvisninger (av 54 mulige) for de forskjellige forsøkspersonene. For V1-grupper ble det gitt positive påvisninger for 54, 38 og 30 (av 96 mulige) for de forskjellige forsøkspersonene, mens det for V2-gruppen ble gitt positive påvisninger for 52, 41, og 31 (av 96 mulige) for de forskjellige forsøkspersonene.

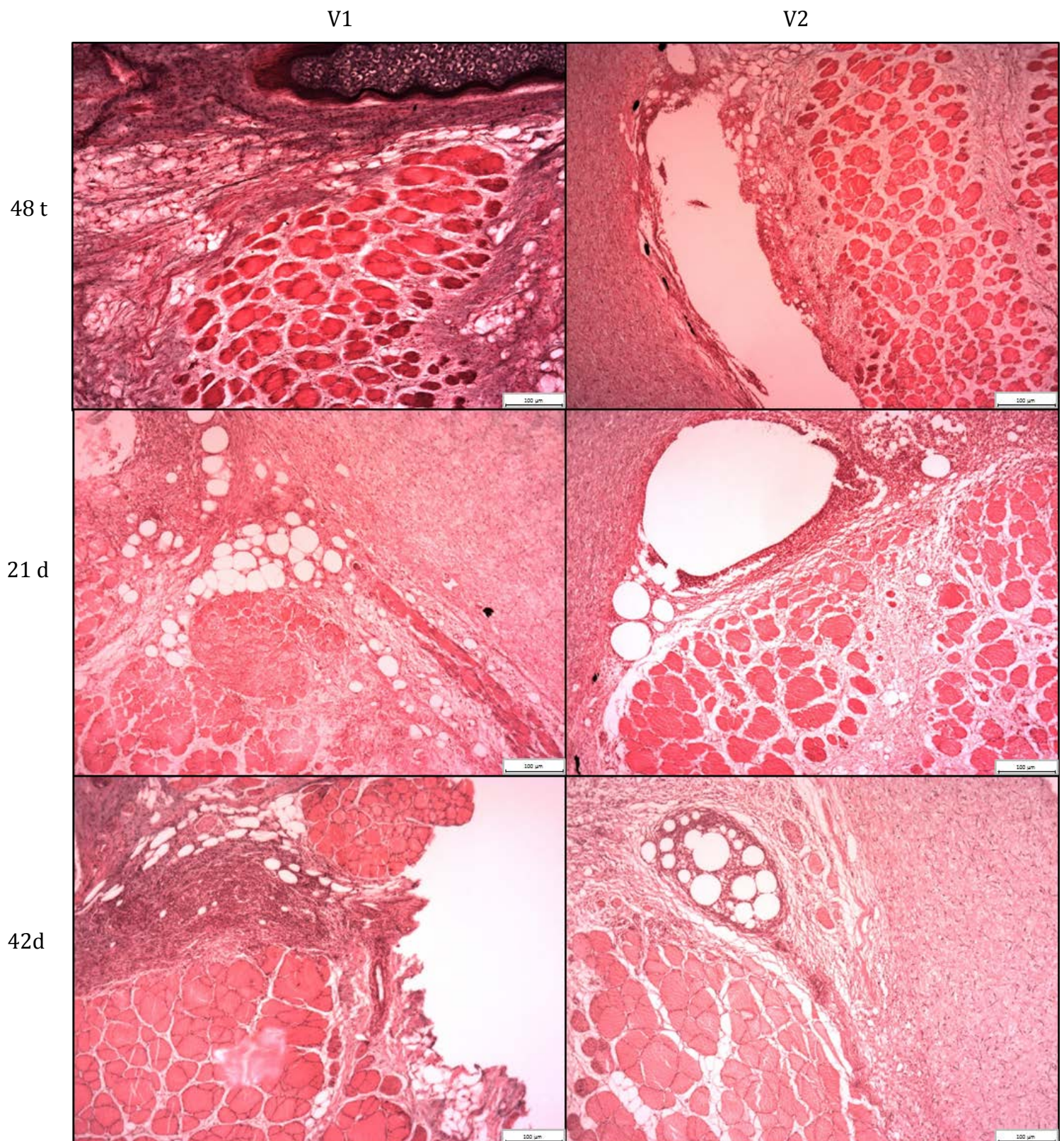
Resultatene viste en variasjon i gradering fra de forskjellige forsøkspersonene, og at forsøksperson 1 (ikke blindet) graderte flere snitt som positive (+) enn de to andre forsøkspersonene. Videre ble det gjort forsøk med gradering (0-3) av snitt. Stor grad av variasjon i inflammasjon og nekroser mellom prøvene, gjorde imidlertid dette vanskelig å gjennomføre i praksis. Av tidsmessige årsaker, ble gradering dermed ikke gjennomført. Variasjonen mellom snitt (utvalg) med positive gradering er illustrert i figur 26.

Bildene i figur 26 viser noen av de mest omfattende betennelsesreaksjonene som ble observert i løpet av forsøket. Inflammasjon og nekroser ser ut til å være mest konsentrert i området rundt stikkstedet og inn mot ryggbeinet. De fleste granulom-lignende strukturene ble observert i overgangen mellom dermis og skjelettmuskulatur, og det oppsto i enkelte tilfeller hulrom/krater i området der vaksinen var deponert mellom dermis og muskulatur. Et eksempel på dette, fra uttaket ved dag 7, er vist i figur 25.



**Figur 25. Vaksinedeponi mellom skjelettmuskulatur og dermis.**

Bildet ble tatt 7 dager etter immunisering. Foto: Martin Rønbeck Lundberg



Figur 26. Illustrasjonsbilder for variasjon mellom snitt (utvalg) med positiv gradering.

Målestokk tilsvarer 100  $\mu\text{m}$ , og bildene ble tatt ved 10 x forstørrelse.

## 5. Diskusjon

Videre vekst i oppdrettsnæringen er i dag først og fremst begrenset av problematikken rundt lakselus, og rensefisk blir i økende grad benyttet som avlusningsmetode. Man ser spesielt en økning i bruk av oppdrettet rognkjeks, og det er ønskelig at videre vekst i bruk av rensefisk skal baseres på oppdrettet fisk.

Det er i dag et høyt svinn av rensefisk etter utsett i sjø, og dødelighet opp mot 40 % har blitt rapportert fra næringen (17). Undersøkelser utført av Veterinærinstituttet viste at bakteriesykdommer, og da spesielt infeksjoner med atypisk *A. salmonicida*, har vært den mest omfattende årsaken til dødelighet i 2015 (24). Den høye dødeligheten, til tross for at over 60 % av sjøsatt rognkjeks fra anlegg i undersøkelsen var vaksinert, indikerer at dagens vaksiner ikke gir en fullverdig beskyttelse.

I denne oppgaven ble nye injeksjonsvaksiner for rognkjeks, fra Vaxxinova Norway AS, testet ut. Agenset i vaksinerne var en blanding av bakterietypene atypisk *Aeromonas salmonicida* (A-lag type 5 og 6), *Vibrio anguillarum* O1 og *Moritella viscosa*, som ble blandet i en vann-i-olje emulsjon.

Den eneste forskjellen mellom sammensetningen av vaksinerne var adjuvanten, som var basert på henholdsvis vegetabilsk olje (V1) og mineralolje (V2). Disse ble testet opp mot hverandre, samt mot en kontrollgruppe (PBS).

Vaksinerne ble testet i forhold til antistoffrespons ved hjelp av ELISA, samt dyrevelferdsmessige parametere (vekst, bivirkninger og dødelighet). Det ble, i tillegg til å undersøke immunologisk respons og annen påvirkning etter vaksinering, også gjort forsøk med IM og IP injeksjon. Histologiske undersøkelser ble gjennomført for å avdekke eventuelle vaksine-induserte skader/bivirkninger for IM-grupper, mens Speilbergs skala ble benyttet for IP-grupper.



### 5.1 Velferdsindikatorer

All form for håndtering av fisk i oppdrett kan føre til ubehag, med påfølgende økt stress og redusert velferd. Vaksinerings ved IM eller IP injeksjon, medfører i tillegg stikksår og brudd på fiskens hudbarriere, noe som kan svekke fiskens forsvar mot infeksjoner. Hvis ikke god hygiene blir opprettholdt under vaksinerings, kan patogener komme inn via nål og injeksjonsvæske. I tillegg vil injiserte vaksiner, som i enkelte tilfeller kan gi omfattende bieffekter hos fisk, kunne gi langvarig redusert velferd. I dette forsøket ble flere forskjellige velferdsindikatorer registrert, med mål om å gi en dypere forståelse for hvordan de forskjellige vaksiner innvirker på fisken.

#### *5.1.1 Endring i vekst – påvirkning av vaksiner og injeksjonsmetode?*

I dette forsøket ble tilvekst etter immunisering benyttet som en indikator på velferd. Fiskens vekt ble målt i forkant av immunisering, og det ble registrert en tilnærmet lik gjennomsnittsvekt for samtlige grupper. Forsøket ble gjennomført slik at grupper med forskjellige injeksjonsmetoder ble adskilt i hvert sitt kar. Den eneste variasjonen innenfor hvert av disse karene, var at fisken ble administrert vaksiner (V1 og V2) eller PBS. Det ble ikke påvist vesentlig variasjon (f.eks. i temperatur, lys eller oksygenmetning), mellom de forskjellige karene i løpet av forsøket. For å beregne fiskens tilvekst etter immunisering, ble resultater fra målingene ved dag 0, dag 21 og dag 42 benyttet.

Det ble observert forholdsvis normal adferd i begge karene kun få timer etter vaksinerings. Fisken viste høy aktivitet i karene for både IM og IP injiserte grupper, og enkelte fisk responderte ved presentasjon av fôr i overflaten. Sistnevnte ble ikke tilstrekkelig dokumentert i form av bilder eller film, og det var vanskelig å se hvilke fiskegrupper (V1, V2 eller PBS) som responderte på fôring. I følge vaksineringsmanualen til PHARMAQ AS (50), forventes normal appetitt hos rognkjeks etter relativt kort tid, og senest 7-9 dager etter vaksinerings. Manualen er laget med hensyn til vaksinerings via IP injisering av oljebaserte vaksiner. Våre observasjoner samsvarer godt med forventningene her.

Resultatene for tiden etter immunisering viste lavere gjennomsnittsvekt for vaksinerte grupper sammenlignet med PBS-grupper, uavhengig av administrasjonsmetode frem t.o.m. dag 42. Da PBS-gruppen i begge karene viste god tilvekst og normal adferd gjennom hele forsøket, er det ingen grunn til å tro at disse, og dermed heller ikke de vaksinerte gruppene, ble vesentlig påvirket av andre eksterne eller interne faktorer i løpet av forsøket. Man kan med andre ord gå ut fra at lavere tilvekst hos vaksinerte grupper, faktisk ble forårsaket av vaksinene. Til nå har få, om noen, forsøk blitt gjennomført med fokus på tilvekst hos rognkjeks etter vaksinerings. Redusert tilvekst har dog blitt påvist etter vaksinerings for en rekke andre arter, blant annet for laks (63, 64), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* W.)(65), røye (*Salvelinus alpinus* L.)(66), sik (*Coregonus lavaretus* L.)(67), flekksteinbit (*Anarhichas minor* L.)(68) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus* L.)(68). Andre forsøk har vist at laks vaksinert IP med oljebaserte vaksiner, viser redusert interesse for mat i løpet av de første timene etter vaksinerings (69). Det har også blitt vist at den reduserte appetitten kan vare i alt fra noen få dager og opp til flere uker (70). Våre resultater for rognkjeks, samsvarer godt med samtlige av disse tidligere forsøkene.

Det ble ikke observert signifikante forskjeller i vekst mellom de vaksinerte gruppene (V1 og V2) t.o.m. dag 42. Resultatene fra IP injiserte fiskegrupper viste dog en noe lavere tilvekst for V1-gruppen, sammenlignet med V2-gruppen frem t.o.m. dag 42. For IP-fisk ble det vist signifikant forskjell mellom V1- og PBS-gruppen i perioden, men ikke mellom V2- og PBS-gruppen. Dette kan være en indikasjon på at V1 gir sterkere negative innvirkninger på vekst enn V2 i tiden rett etter vaksinerings. Tidligere forsøk gjennomført av Vaxxinova (pers. med. Øyvind Vågnes, Vaxxinova Norway AS, april 2016) har vist det motsatte for laks og leppefisk, og våre resultater samsvarer dermed ikke med det forventede resultatet. Den eksakte årsaken til dette ble ikke påvist. En mulig årsak er at emulsjonen i vaksinen kan ha sprukket/delt seg, noe som fører til at agenset ikke fordeles jevnt over tid. En annen mulighet er at det kan ha vært urenheter i den vegetabilske oljen som ble brukt ved tillaging av vaksinen som ble brukt i vårt forsøk. Dette kan i så fall ha gitt økt irritasjon i bukhulen (pers. med. Kurt Ingar Draget, avdeling for bioteknologi ved NTNU, april 2016). Resultatet kan også skyldes naturlige variasjoner mellom fisk på individnivå, eller andre biologiske faktorer. Siden resultatet er basert på

gjennomsnittsverdier, før og etter slakting og prøveuttak, er det også mulig at forskjellen skyldes statistiske variasjoner.

SGR-verdiene for IP-gruppene viste en lavere vekstrate for V1-gruppen, sammenlignet med V2- og PBS-gruppen frem t.o.m. dag 21. Dette jevner seg derimot ut i løpet av neste vekstperiode, og høyeste SGR-verdi ble observert for V1-gruppen ved dag 42. Den noe økte vekstraten for V1-gruppen etter dag 21, kan være en indikasjon på at fisken har klart å overkomme noen av problemene som oppsto i tiden rett etter vaksinasjon. Dette har tidligere blitt observert for laks i tiden etter IP injeksjon (71). Økningen i vekst for V1-gruppen observeres samtidig med en svakere vekst for V2- og PBS-gruppen. Årsaken til redusert vekst hos disse gruppene er usikker. Siden endringen blir observert både for den vaksinerte gruppen (V2) og for PBS-gruppen, er det nærliggende å tro at dette ikke er forårsaket av vaksinen alene. Redusert tilvekst ble også registrert for vaksinerte IM-grupper etter dag 21, men ikke for PBS-fisk. Dette kan være et tegn på at IP injeksjon i seg selv kan gi redusert tilvekst over tid, men det er vanskelig å trekke sikre konklusjoner ut fra våre resultater.

Siden tilvekst er beregnet ut fra gruppevis gjennomsnittsvikt, er det heller ikke usannsynlig at forskjellene for denne perioden skyldes variasjoner i utvalget av fisk som ble tatt ut og veid ved de forskjellige tidspunktene. Resultatene fra statistiske sammenligninger av gjennomsnittsvikt for vaksinerte grupper, viste ingen signifikante gruppeforskjeller frem t.o.m. dag 42. Dette ble vist uavhengig av IM eller IP injeksjon. Det kan dermed ikke konkluderes med noen forskjell i vekst etter vaksineringsmetode V1 og V2, eller mellom injeksjonsmetodene som ble undersøkt i dette forsøket. Dette gjelder for vekst i perioden frem t.o.m. dag 42.

IM injeksjon er vanlig i bruk ved DNA-vaksineringsmetode mot virus (72), men effekten av IM injeksjon av oljebaserte vaksiner har i liten grad blitt undersøkt. Et forsøk har blitt utført av Treasurer og Cox (73), med injeksjon av en oljebasert vaksine i *dorsal median sinus* (*dms* - fettvevet under dorsalfinnen) hos laks. IM-injeksjon, som ble testet i vårt forsøk, er i praksis bare en noe dypere *dms*-injeksjon, hvor man penetrerer dypere og inn i selve muskellaget. I forsøket til Treasurer og Cox ble respons etter vaksineringsmetode via *dms* og IP injeksjon sammenlignet, og resultatene viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene. Våre resultater for rognkjeks, samsvarer godt med dette.

### *Statistiske utfordringer ved beregning av tilvekst*

Det må nevnes at beregning av tilvekst ikke var en hovedprioritet ved konstruering av forsøksoppsettet, sammenlignet med prøvetaking og analyser av disse. Fisken i forsøket ble merket i forhold til injeksjonsmetode og administrerte injeksjonsløsninger (V1, V2 eller PBS), men individmerking ble ikke gjennomført. Følgelig baseres statistikken for vekst på en gruppevis gjennomsnittsvekt ved de ulike uttakstidspunktene.

Dette gjennomsnittet vil variere, da fisken som ble veid f.eks. på dag 21, og deretter avlivet for prøveuttak, ikke lenger er til stede og kan veies igjen på dag 42. Det vil i tillegg være vanskelig å få til et «hundre prosent» tilfeldig utvalg ved håving av fisk ved de forskjellige uttakene. Dette vanskeliggjøres spesielt ved at fisken suger seg fast og oppholder seg på vidt forskjellige steder i karet.

For å beregne fiskens tilvekst etter immunisering, ble resultater fra målingene ved dag 0, dag 21 og dag 42 benyttet. På disse uttakene ble det tatt ut fisk fra både IM- og IP-grupper. Dette var også de uttakene hvor det var minst variasjon i antall fisk som ble tatt ut fra de forskjellige gruppene.

For IM-gruppen ble det på dag 21 tatt ut kun 4 fisk fra V2-gruppen, mot 10 i de andre gruppene. Årsaken til dette var at man, på grunn av tidligere høy dødelighet i V2-gruppen, valgte å ta ut færre fisk fra denne gruppen ved dette tidspunktet. Dette gir et noe svakere grunnlag for statistiske sammenligninger.

Ved dag 84 var det høy variasjon i antall gjenværende fisk i IM-gruppen. Da var det 2, 4 og 5 fisk igjen i henholdsvis V1-, V2- og PBS-gruppen, som alle ble tatt ut for prøvetaking. Den høye gruppevariasjonen på dette tidspunktet gjorde resultatene uegnet for statistiske sammenligninger både innad i IM-gruppen, og mot IP-gruppen. Resultatene ble heller ikke vurdert gunstig for sammenligning mot tidligere uttak (der  $n=10$ ). Det samme gjaldt for IP-gruppen ved dag 84. Her var det kun 5 fisk igjen i de forskjellige gruppene. Sammenligninger mot tidligere uttak ville i beste fall blitt upålitelige.

Resultatene for dag 84 ble derfor ikke tatt med ved sammenligning av vekst-data, og står oppført i appendiks II.

### 5.1.2 Scoring av bivirkninger - IP-grupper

#### *Adheranser – Speilbergs skala*

Scoring etter Speilbergs skala, er en subjektiv analysemetode som benyttes for å gradere adheranser i bukhulen hos fisk i etterkant av IP vaksinerings. Det ble benyttet en modifisert versjon av Speilbergs skala i dette forsøket (metoden finnes på side 23). Adheranser ble gradert på en skala fra 0-6 etter omfang og alvorlighetsgrad, i sammenheng med prøveuttakene på dag 21, dag 42 og dag 84.

Resultatene viste en høyere gjennomsnittlig scoring for V1-gruppen enn for V2-gruppen for alle måletidspunktene, og adheranser ble ikke observert hos fisk i PBS-gruppen. Statistiske analyser viste signifikant forskjell mellom V1- og V2-gruppen på dag 21 og dag 42, men ikke på dag 84. Den eneste variasjonen i behandling av fisk, var forskjellen i administrerte injeksjonsløsninger. Da all fisk i PBS-gruppene fikk score 0, kan vi dermed gå ut fra at adheransene som ble observert hos vaksinerte grupper, faktisk skyldtes vaksinene.

Resultatene fra målingene ved dag 21, viste en variasjon i scoring for enkeltfisk mellom gradene 2-4. Gjennomsnittsverdien ble målt til 3,4 for V1-gruppen, og til 2,6 for V2-gruppen (se resultater på side 42). Disse verdiene, spesielt for V1-gruppen, er noe høyere enn forventet av produsent (pers. med. Øyvind Vågnes, Vaxxinoa Norway AS, april 2016). Årsaken til de høye verdiene for V1 er uviss, men kan skyldes en feil med vaksinen (se diskusjon på side 71). Resultatene fra dag 42 viste en tilsvarende variasjon i scoring for enkeltindivider som ved dag 21, men gjennomsnittsverdiene var noe lavere. Siden forskjellen er så liten, skyldes dette mest sannsynlig naturlig variasjon mellom individer. Resultatene for enkeltindivider står oppført i appendiks III. Målingene ved dag 21 og dag 42 ble gjennomført av samme person.

Få, om noen, forsøk er gjennomført for rognkjeks når det kommer til adheranser etter IP vaksinerings. Speilbergs skala har derimot blitt benyttet for laks i en årrekke. I forsøket til Midtlyng et al. (37), ble laks vaksinert IP med forskjellige vaksiner. Blant annet ble to vaksiner med oljebaserte adjuvanter undersøkt. Fisken ble kontrollert i forhold til adheranser 6 uker, 3 måneder og 6 måneder etter vaksinerings. Her ble adheranser

observert ved alle tre målingene, med høyest gjennomsnittsverdi (ca. 4,2) målt etter 6 måneder. Resultatene fra målingene etter 6 uker og 3 måneder ble ikke oppgitt i artikkelen, men var vesentlig lavere enn ved 6 måneder. I et forsøk gjennomført av Berg et al. (71), ble adheranser hos laks scoret til en gjennomsnittsverdi på 2,45 etter 6 uker, med deretter økt omfang og alvorlighetsgrad i løpet av forsøkets varighet på ca. 6 måneder. I et lignende forsøk gjennomført av Poppe og Breck (74), ble adheranser hos laks observert 12 måneder etter vaksinasjon. Graden av adheranser varierte mellom 0-5, mens grad 6 ikke ble observert. Høyere gradering (t.o.m. grad 6) har blitt observert for regnbueørret av Rønsholdt og McLean (65), men kun i få tilfeller (< 5 %). Et forsøk med torsk (*Gadus morhua* L.), gjennomført av Mutoloki et al. (75), viste til sammenligning en gjennomsnittlig scoring av adheranser på 2,0 og 2,2, henholdsvis 12 og 25 uker etter IP vaksinerings. Resultatene fra de overnevnte forsøkene viste at adheranser kan vedvare i fisken i lang tid etter vaksinerings, og at alvorlighetsgraden kan variere mellom forskjellige arter og administrerte vaksiner.

Våre resultater for V2-gruppen, 42 dager (6 uker) etter vaksinerings, stemmer godt overens med resultatene til Berg et al. (71). Resultatene for V1-gruppen er dog noe høyere enn det som har blitt vist i evaluerte rapporter for laks og andre arter på dette tidspunktet. Stor variasjon mellom arter og administrerte vaksiner, gjør det imidlertid vanskelig å sammenligne våre resultater med andre forsøk. En god oversikt over hva som har blitt påvist i andre forsøk, er likevel til stor hjelp når man skal evaluere egne resultater.

Ved dag 84 viste våre resultater en økt grad av adheranse hos fisken. Her ble det vist en variasjon i scoring for enkeltfisk mellom gradene 4-6. Målingene på dette tidspunktet ble gjennomført av en annen person enn ved dag 21 og dag 42. Siden dette er en subjektiv evaluering, er det mulig at de høye resultatene mer skyldes skjønn, enn faktiske forhold i fisken. Det er også mulig at variasjonen gikk den andre veien, og at personen som gjennomførte målingen på dag 21 og dag 42 skjønnsmessig ga lavere score enn det faktiske forholdet i fisken. Denne problematikken kunne vært unngått hvis fiskens gruppetilhørighet hadde vært blindet, men dette var vanskelig å gjennomføre ved prøvetaking i felt. Samtidig har tidligere forsøk med andre arter vist at graden av adheranser har en tendens til å øke over tid (37, 65, 71, 75), noe som også kan være gjeldene for rognkjeks.

### *Vaksinerester og melanin*

I tillegg til scoring av adheranser via Speilbergs skala, ble fisken også undersøkt i forhold til tilstedeværelse av vaksinerester og melanin i bukhulen. Begge parameterne ble gradert på en skala fra 0-3 etter omfang og alvorlighetsgrad. Undersøkelsene ble gjennomført i sammenheng med prøveuttakene på dag 21, dag 42 og dag 84, og det ble ikke påvist vaksinerester hos fisk i PBS-gruppene.

Det ble påvist vaksinerester hos alle vaksinerte grupper i løpet av uttakene etter dag 0. Resultatene fra dag 21 viste en variasjon i scoring for enkeltfisk i V1-gruppen mellom gradene 1-3. Til sammenligning varierte scoringene for fisk i V2-gruppen mellom gradene 0-1 på det samme tidspunktet. Dette indikerer at nedbrytningstiden, og/eller graden av videredistribusjon av de to vaksinene, er høyst forskjellige. Dette er som forventet fra produsent (pers. med. Eivind Isdal, Vaxxinova Norway AS, oktober 2015). Resultatene fra målingen ved dag 42 viste en liknende trend, men med lavere verdier enn ved dag 21. Variasjonen mellom enkeltindivider i V1-gruppen ligger mellom gradene 1-2, mens all fisk i V2-gruppen ble scoret til grad 0. Dette bekrefter resultatene fra dag 21. Målingene ved dag 21 og dag 42 ble gjennomført av en og samme person.

Resultatene fra målingen ved dag 84 viste ganske like verdier for V1- og V2-gruppen. Gradering for enkeltfisk varierte mellom 0-1 for begge gruppene. Målingene på dette tidspunktet ble gjennomført av en annen person enn på dag 21 og dag 42. Man ser her de samme utfordringene som for scoring av adheranser (se diskusjon på side 75), hvor forsøkspersonell ble endret for det siste uttaket. Da det er usannsynlig at det har vært en faktisk økning i vaksinerester for V2-gruppen fra dag 42 til dag 84, kan man gå ut fra at økningen skyldes variasjon i forsøkspersonell.

Melanin ble ikke observert for noen av gruppene i forsøket. Årsaken til dette er uviss, da melanin ofte har blitt påvist for andre arter (37, 65, 70, 71, 75, 76). Fravær av melanin etter IP vaksinerings av rognkjeks, har dog blitt vist i et tidligere forsøk av Erkinharju et al. i 2015 (upubliserte resultater, presentert på EAAP-konferanse i september 2015)(77). Et nylig utført forsøk med torsk, har også vist lignende resultater (78).

### 5.1.3 Dødelighet

Dødelighet ble i dette forsøket i hovedsak observert i løpet av de første 48 timene etter immunisering. Akutt dødelighet på dag 0 var spesielt fremtredende hos V2-gruppen. Det ble ikke observert dødelighet hos IP injisert fisk eller for PBS-grupper, og det ble ikke observert dødelighet hos fisk som ble vaksinert og oppstallet for uttak ved 1 og 4 timer.

Resultatene for Gr. 1, viste en akutt dødelighet på 20 % hos V2-gruppen i løpet av de første 8 timene etter vaksinerings. Dødeligheten var på 30 % etter 48 timer, og dette var også den totale dødeligheten for fisk vaksinert med V2. Akutt dødelighet ble ikke registrert for V1-gruppen på dag 0, og dødeligheten 48 timer etter vaksinerings var på 4 %. Den totale dødeligheten for V1-gruppen økte til 6 % innen slutten av forsøket.

Til sammenligning viste resultatene for Gr. 2 (ikke presentert i oppgaven) en akutt dødelighet på 2 % for V1-gruppen. Den totale dødeligheten var på 4 %. Det ble heller ikke her registrert dødelighet hos IP vaksinert fisk, eller i PBS-gruppene. Resultatene som ble vist her for V1-gruppen, fungerer i praksis som en kontroll for resultatene i Gr. 1. Dette gjør at man med høyere sikkerhet kan gå ut fra at den lave dødeligheten etter vaksinerings med V1 ikke skyldes tilfeldigheter. Gjentatte forsøk kreves for å verifisere dette.

En vesentlig svakhet i forsøksoppsettet, når det kommer til registrering av dødelighet, er at fisk ble tatt ut for prøvetaking i løpet av forsøket. Sannsynligheten er høy for å ta ut fisk som ville dødd av seg selv ved et senere tidspunkt, og den totale dødeligheten i forsøket kunne potensielt ha vært høyere enn det som ble registrert.

Forhøyet dødelighet etter vaksinerings kan være forårsaket av mange faktorer (70, 79). All form for håndtering kan virke stressende på fisken, men er normalt i seg selv ikke nok til å forårsake omfattende dødelighet. Faren for å påføre fisken skader ved f.eks. håving og merking er dog alltid tilstede, men dødelighet forårsaket av slike skader vil som oftest forekomme en tid etter vaksinerings. Siden all fisk ble behandlet likt gjennom hele forsøket, er det ikke nærliggende å tro at håndtering eller håndteringsskader i seg selv er årsaken til den akutte dødeligheten i V2-gruppen. Andre potensielle årsaker, mer direkte knyttet til selve vaksinen, kan være autoimmunitet eller andre systemiske lidelser. Dette har blant annet blitt påvist hos laks etter vaksinerings med oljebaserte vaksiner (80-82).



Det ble imidlertid ikke gjort forsøk på å påvise slike lidelser hos fisk i vårt forsøk. Histologiske undersøkelser viste heller ingen klare tegn som kunne forklare dødeligheten, og dødsårsaken må derfor registreres som udefinert. De histologiske undersøkelsene i dette forsøket omfattet kun prøver av stikksted og ryggmuskulatur, noe som begrenser mulighetene for å påvise dødsårsaken. Andre undersøkelser som eventuelt kunne gitt mer informasjon, er å ta histologiprøver fra dødfisk og se etter eventuelle trombedannelser i koronararteriene til hjertet eller i gjellene (pers. med. Trygve Poppe, april 2016). I og med at dødeligheten oppsto såpass akutt, kan det virke som at det ligger noe toksisk eller sjokk-relatert til grunn.

For tidligere forsøk med dms- og IP injeksjon av laks, gjennomført av Treasurer og Cox (73), ble det til sammenligning registrert en kumulativ dødelighet på mellom 1-5 % for grupper med IP-fisk, og en dødelighet på mellom 0,5-1 % for grupper med dms-fisk. Dødeligheten ble i hovedsak registrert i løpet av de første 24 timer etter vaksinerings. Her ble det påvist en høyere dødelighet for IP-fisk, men en høy andel av dødeligheten her var forårsaket av soppinfeksjoner (*Saprolegnia*), og kunne ikke direkte knyttes til selve vaksinerings. Resultater fra forsøk med laks, er nødvendigvis ikke direkte sammenlignbare med våre. Det er dog interessant at deres resultater fra histologiske undersøkelser av dødfisk fra dms-gruppene, viste tegn på muskelskader ved injeksjonsstedet. Dette ble notert som et tegn på at selve injeksjonen hadde blitt satt for dypt i disse tilfellene, og det ble ansett som den mest omfattende årsaken til dødelighet i dms-gruppene.

Da vaksinerings av rognkjeks er et forholdsvis nytt tema, og da spesielt vaksinerings via IM injeksjon, er det vanskelig å finne kilder til sammenligning med resultatene i vårt forsøk. Høy akutt dødelighet har dog blitt vist for rognkjeks ved diverse sikkerhetsforsøk gjennomført av PHARMAQ AS (83). I deres resultater, presentert blant annet på et seminar i Tromsø i 2014, ble det vist høy dødelighet for forsøk med IM vaksinerings av små rognkjeks. Fiskens størrelse var her på 3,5-5 cm ved vaksinerings, og det ble gjort forsøk med forskjellige injeksjonsmetoder. Fiskene ble vaksinert med en mineralolje-basert vaksine via IM eller IP injeksjon. Dette var forsøk som ble gjennomført for å teste ytterpunkter for sikker vaksinerings av rognkjeks. Deres resultater viste en dødelighet på mellom 0-1 % for fisk vaksinert via IP injeksjon, og en dødelighet på i overkant av

35 % for fisk vaksinert via IM injeksjon. All dødelighet ble her observert i løpet av de første 5 døgn etter vaksineringsmetode.

Vårt forsøk viste liknende resultater for både IM og IP injiserte fisk med V2 i Gr. 1. Høy dødelighet etter vaksineringsmetode av fisk i denne gruppen, samt resultatene fra forsøkene til PHARMAQ AS med små rognkjeks (83), var hovedårsaken til at man valgte å ikke vaksinere fisk i Gr.2 (fisk mellom 4-8 gram) IM med V2. Hvilken innvirkning fiskens størrelse ville hatt for dødelighet etter vaksineringsmetode er uvisst, og dette er noe som eventuelt bør testes videre i et annet forsøk.

### *Oppsummering av velferdsindikatorer*

Resultatene viste redusert tilvekst for vaksinert fisk, men ingen signifikant forskjell mellom V1- og V2-gruppen frem t.o.m. dag 42. For IP-fisk ble det dog påvist lavere tilvekst for V1-gruppen i den samme perioden. Dette kan ha en sammenheng med samtidig høy grad av adheranser i bukhulen. Gjennomsnittlig gradering på Speilbergs skala var for V1-gruppen på over 3 ved dag 21 og dag 42. Grad 3 og opp regnes for å ha vesentlig innvirkning på fiskens vekst og velferd (8). Selv om våre resultater viste indikasjoner på vesentlig redusert velferd for IP vaksinerte fisk, ble det ikke påvist dødelighet for IP-grupper i løpet av forsøket.

For IM-gruppene ble dødelighet i hovedsak registrert som akutt dødelighet på dag 0, for fisk vaksinert med V2. Årsaken til den høye dødeligheten ble ikke påvist. De samlede resultatene for velferd indikerer vesentlige forskjeller mellom V1 og V2, samt mellom IM og IP injeksjon som vaksineringsmetode.

## 5.2 Antistoffrespons

ELISA er en kvantitativ analysemetode som ofte brukes for å evaluere antistoffrespons hos fisk etter vaksinerings. Mengden antistoff (IgM) detektert i fiskens serum, mot de antigenene som blir induisert via vaksinen, er en god indikator for vaksineringsrespons. Økt tilstedeværelse av antistoff i blodet etter vaksinerings, vil kunne gjøre fisken bedre rustet til å bekjempe en eventuell infeksjon når den oppstår. I vårt forsøk ble det tatt blodprøver av fisken før immunisering på dag 0, samt ved prøveuttakene på dag 21, dag 42 og dag 84.

Resultatene fra forsøket viste betydelige forskjeller mellom tilstedeværelse av IgM i serum fra vaksinert fisk og uvaksinerte kontroller. Det ble også vist en økende trend for antistoffrespons i tiden etter vaksinerings, og høyeste OD-verdier ble observert for serumprøver fra vaksinert fisk fra dag 42 og dag 84.

### 5.2.1 Antistoffrespons – serum-pools

Resultatene viste høyest antistoffrespons mot de to gruppene av *A. salmonicida*, sammenlignet med respons mot *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa*. Dette ble vist, uavhengig av forskjell i administrerte vaksiner eller injeksjonsmetoder. Det eneste unntaket ble observert ved sammenligning av respons for V1 ved IM og IP injeksjon i plateoppsett 3 (se resultater på side 50), mot *A. salmonicida* gr. 6. Da det ble observert ganske lave verdier for samtlige grupper på denne platen, er det nærliggende å tro at resultatet skyldes platefeil eller feil med avlesning/måling etc. Hvis man ser bort fra dette enkeltresultatet, ser man en generell trend med høye verdier for platene coatet med *A. salmonicida*. Ved sammenligning av resultater for *A. salmonicida* gr. 5 og gr. 6, ble det i de fleste tilfeller vist noe lavere respons mot gr. 5. Forskjellen her var imidlertid ganske liten, og kan være forårsaket av variasjoner mellom enkeltprøver og/eller plater.

Mens vaksinerings mot klassisk furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*), har vært gjennomført med stor suksess siden 1990-tallet, har forsøk med vaksinerings mot atypiske varianter blitt vist mindre vellykket. Å lage effektive vaksiner mot atypisk *A. salmonicida* for laks og regnbueørret har vist seg vanskelig, og flere forsøk har vist svært varierende resultater (84). Andre forsøk med torsk har vist lovende resultater, men

vaksineresponsen var imidlertid høyst varierende for individer (85-87). Vaksinerespons mot atypisk *A. salmonicida* har i løpet av de par siste årene blitt vist både for berggylt (88) og rognkjeks (89), men flere og mer omfattende forsøk er nødvendige for å trekke sikre konklusjoner. Våre resultater for rognkjeks viste god vaksinerespons ved ELISA, men resultatene er i seg selv ikke konklusive.

Våre resultater for *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa* viste til sammenligning mye lavere respons, med samtlige verdier målt til under 0,6 (og flere verdier målt til under 0,2). Verdiene var så lave at det vanskeliggjorde sammenligning av resultater, og det var heller ikke en like klar trend med økende respons over tid. Tidligere forsøk, gjennomført med sammenligning av vaksinerespons mot blant annet atypisk *A. salmonicida* og *V. anguillarum* hos torsk, viste noe høyere og jevnere respons mot atypisk *A. salmonicida* (85, 86). Vaksiner mot *V. anguillarum* og *M. viscosa* har tidligere vist å ha forholdsvis god effekt for laks (90). For rognkjeks har enkeltforsøk vist relativt lik respons mot atypisk *A. salmonicida* og *V. anguillarum* (89), mens forsøk med *M. viscosa* ikke har blitt gjennomført tidligere. Årsaken til den lave responsen i vårt forsøk, er derfor uviss.

Ved sammenligning av resultatene for V1 og V2 i plateoppsett 1-2 (side 47-50), ble det vist en generelt lavere respons for V1 mot *A. salmonicida* (gr. 5 og 6). Unntaket var for IP-fisk mot *A. salmonicida* gr. 5, hvor det ble vist en OD-verdi på 0,94. Forutenom akkurat denne målingen, var differansen mellom høyeste verdi for V1 og V2 ganske stor for samtlige plater. Den største differansen i OD-verdi mellom V1 og V2, var på 1,49 for IM-fisk mot *A. salmonicida* gr. 6. Da den samme trenden i forskjell mellom V1 og V2 ble påvist for flertallet av platene i disse oppsettene, er det nærliggende å tro at de observerte ulikhetene er reelle. Med «reelle» menes her at forskjellen mellom gruppene ikke er forårsaket av variasjoner mellom enkeltprøver eller plater. Da kontrollprøvene ga relativt like resultater for alle platene, er det heller ikke spesielt trolig at gruppevariasjonen skyldes pipetteringsfeil eller lignende svikt hos forsøkspersonell. Resultatene fra plateoppsett 1-2 viste en jevnt over lav respons for vaksinerings med V1, sammenlignet med vaksinerings med V2. Unntaket her var for IP vaksinert fisk, mot *A. salmonicida* gr. 5. Lav vaksinerespons ved ELISA er dog ikke ensbetydende med lav beskyttelse, og effekten (beskyttelsesgrad) av de forskjellige vaksine-adjuvantene må derfor testes ved et senere smitteforsøk.

Få forsøk har blitt gjennomført med fokus på sammenligning av vaksinerespons etter injeksjon av vegetabiliske- eller mineraloljebaserte adjuvanter for fisk. Et forsøk har blitt gjennomført av Haugland et al. (91), som viste vaksinerespons for laks etter vaksinerings med vegetabiliske olje-adjuvanter. Tidligere forsøk har også vist vaksinerespons og beskyttelse av vaksiner med vegetabiliske oljeadjuvanter for kylling (92), og ga i flere tilfeller tilsvarende beskyttelse som mineral-olje baserte vaksiner i forsøket. Et annet forsøk gjennomført for mus viste dog ikke-målbart vaksinerespons ved ELISA, for en malaria-vaksine basert på adjuvanter av solsikkeolje og drueolje (93). Vegetabiliske olje-adjuvanter ble her sammenlignet med hai-leverolje (squalene), som viste vesentlig høyere respons. Selv om det er vanskelig å finne kilder som sammenligner immunologisk effekt av de forskjellige typene av adjuvanter i vaksiner for fisk, har flere forsøk for andre arter vist immunologisk effekt for vegetabiliske oljeadjuvanter. Det virker som om denne effekten varierer i noe høyere grad for vegetabiliske oljeadjuvanter enn for mineraloljebaserte adjuvanter. Høy variasjon i arter og testede vegetabiliske oljer i forsøkene, gjør det dog vanskelig å sammenligne immunologisk respons.

For sammenligning av injeksjonsmetoder i plateoppsett 3-4 (side 51-54), viste våre resultater relativt lav respons for V1 mot samtlige antigen. Unntaket var resultatene mot *A. salmonicida* gr. 5, hvor det ble vist en OD-verdi på 1,05 for IP-fisk ved dag 84. Selv om resultatene mellom de forskjellige plateoppsettene ikke er direkte sammenlignbare, fungerer dette resultatet som en bekreftelse for resultatet observert i plateoppsett 2.

Samtidig, for plateoppsett 3, viste samtlige andre målinger for V1 verdier under 0,5. Resultatene for V2 viste til sammenligning jevnt over høye verdier mot *A. salmonicida* gr. 5 og 6. Det ble her vist en relativt jevn respons, med verdier på mellom 0,75 og 0,95 for vaksinerte IM- og IP-grupper mot *A. salmonicida* gr. 6 ved dag 42 og dag 84. For platen coatet med *A. salmonicida* gr. 5, ble høyeste verdi (1,34) målt for den vaksinerte IM-gruppen. Differansen mellom IM- og IP-gruppen var her på 0,39. Standardavviket for IP-gruppen på dette tidspunktet var høyt, og verdiene for enkeltindivider var mest sannsynlig relativt likt for IP-fisk ved dag 42 og IM-fisk ved dag 84.

Resultatene fra plateoppsett 3-4, viste lignende resultater for de forskjellige vaksinene som i plateoppsett 1-2. Det virker ikke som om forskjellige injeksjonsmetoder påvirker antistoffrespons i vesentlig grad etter vaksinerings med V2.

For antistoffrespons etter vaksinerings med V1, ble høyest respons vist for IP injisert fisk, noe som indikerer at vaksinerings via IP injeksjon er noe mer effektivt for denne vaksinen. Dette resultatet er dog noe usikkert, da høy respons kun ble observert for to plater (fra plateoppsett 2 og 3) og mot kun ett antigen (*A. salmonicida* gr. 5). Disse resultatene kan være forårsaket av variasjoner mellom individer, eller andre biologiske faktorer. Resultatet kan også være forårsaket av feil i oppmåling/tillaging av løsninger for coating av plater, eller ved fortykning av antistoff. Uavhengig av årsak, som er vanskelig å påvise i etterkant, må disse resultatene regnes som inkonklusive.

Resultatene fra forsøk med laks, gjennomført av Treasurer og Cox (73), viste ingen signifikante forskjeller mellom antistoffrespons for dms- og IP vaksinerne grupper. Våre resultater for rognkjeks samsvarer godt med dette.

En interessant detalj, som ikke ble undersøkt videre i dette forsøket, er at den positive kontrollen (PK) i flere tilfeller viste lik eller høyere respons enn andre vaksinerne grupper. PK er serum-pool fra dag 42, fra IP vaksinerne fisk (V1) fra Gr. 2. Resultatene for PK viste tilnærmet lik eller høyere respons enn samtlige vaksinerne fiskegrupper i Gr. 1, uavhengig av vaksiner eller injeksjonsmetode. Disse resultatene viste med andre ord en høyere respons fra V1-fisk i Gr. 2 (fisk fra 4-8 gram), sammenlignet med vaksinerne fisk fra Gr. 1 (fisk >10 gram) 42 dager etter immunisering.

De sistnevnte resultatene er svært interessante, og serum-prøvene fra Gr. 2 bør undersøkes videre ved en senere anledning.

### 5.2.2 Antistoffrespons – individserum fra dag 42

ELISA-resultatene fra serum-pools viste i praksis en gjennomsnittsverdi basert på vaksinerespons hos individer. Svakheten med dette, er at individuelle variasjoner ikke kommer fram i resultatet. Eventuelle ekstreme individ-verdier (lav/høyrespondere) vil kunne trekke gjennomsnittet ned eller opp, uten at dette kan detekteres. Høyest vaksinerespons (enkeltverdier) ble observert ved dag 84, men variasjonen i antall gjenværende fisk i gruppene gjorde resultatene fra dette uttaket uegnet for statistiske sammenligninger. For å avdekke eventuelle variasjoner mellom enkeltindivider ble det, i tillegg til platene med serum-pools, gjennomført ELISA med individ-serum. Da resultatene fra dag 84 ble vist uegnet for statistiske sammenligninger, ble serum fra dag 42 benyttet.

Resultatene viste, i likhet med resultatene for plater med serum-pools, høyest antistoffrespons mot de to gruppene av *A. salmonicida*, sammenlignet med respons mot *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa*. Samtlige målinger for respons mot *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa* ble målt til under 0,6, og det ble vist relativt lav variasjon for respons mellom enkeltindivider. Det ble heller ikke påvist signifikante forskjeller mellom vaksinerte grupper, uavhengig av injeksjonssted. Disse målingene bekrefter resultatene for *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa* fra platene med serum-pools, t.o.m. dag 42.

Ved sammenligning av respons mot de to gruppene av *A. salmonicida* etter vaksinerings med V1 og V2, i plateoppsett 1-2 (side 55-58), ble det vist signifikante forskjeller mellom de vaksinerte gruppene for alle platene. Dette bekrefter våre resultater fra serum-pools, t.o.m. dag 42.

Det ble samtidig vist en tydelig trend for variasjonen innad i gruppene, med lavest variasjon innad i PBS-gruppen. Variasjonen var noe høyere for V1-gruppen, og høyest for V2-gruppen. Høyest respons ble målt for V2-gruppen, uavhengig av injeksjonssted, men det var stor forskjell på fisk med lav og høy respons innad i gruppen. Differansen mellom høyeste og laveste verdi innad i V2-gruppen for disse platene var på det meste oppe i 1,38 mot *A. salmonicida* gr. 5, for IP vaksinert fisk. Variasjonen mellom IM vaksinerte individer i V2-gruppene var noe lavere, men differansen var fortsatt høy i enkelte tilfeller.

Resultatene viste at selv om gjennomsnitts-responsen er høy for V2-gruppen, sammenlignet med V1-gruppen, er det også stor variasjon mellom grad av respons for enkeltindivider i V2-gruppene. Dette kan potensielt vise seg å gi redusert total beskyttelse (flokkimmunitet) for vaksinen. Dette må testes ved et senere smitteforsøk.

Resultatene for sammenligning av respons og injeksjonsmetoder, i plateoppsett 3-4 (side 59-62), viste ingen signifikante forskjeller mellom IM og IP injiserte V1-grupper. Dette gjaldt for samtlige antigen, og resultatene samsvarer således med resultatene fra serum-pools. Samtlige målinger for V1-fisk viste verdier under 0,5, og variasjonen mellom individuelle fisk var lav.

Resultatene for V2-grupper viste heller ingen signifikante forskjeller mellom IM- og IP-grupper, men variasjonen mellom enkeltindivider var mye høyere for IP vaksinerte fisk. De høyeste differansene innenfor IP-gruppen ble målt til 1,42 og 1,62, mot henholdsvis *A. salmonicida* gr. 5 og 6. De høyeste differansene for IM-grupper ble til sammenligning målt til 0,98 og 0,99, mot henholdsvis *A. salmonicida* gr. 5 og 6. De laveste individ-responsene for IM-fisk ble også vist noe høyere enn for IP-fisk.

Resultatene for V2 samsvarer med resultatene fra serum-pools, men avdekker samtidig en variasjon innad i de vaksinerte gruppene. Resultatene viste at IM vaksinering med V2 gir like høy gjennomsnittlig respons som IP vaksinering med V2, men viste samtidig også at IP vaksinering ga en høyere variasjon i individuell respons. Hvis vaksinerespons viser seg å være ekvivalent med beskyttelse, indikerer våre resultater med andre ord at et større antall fisk vil være dårligere beskyttet ved IP enn ved IM vaksinering. Jo flere godt beskyttede (resistente) individer i en populasjon, dess sterkere blir effekten av flokkimmunitet.

Effekten av IM og IP vaksinering må etterprøves ved et senere smitteforsøk, og man bør vurdere å gjennomføre slike forsøk for flere arter. Hvis IM vaksinering viser seg å gi lik gjennomsnittlig beskyttelse som IP vaksinering, men gir god beskyttelse for flere individer, vil dette være svært aktuelt for oppdrett av "matfisk" som laks og regnbueørret. Spesielt med tanke på tidligere nevnte forsøk, og våre resultater for rognkjeks, som viste redusert tilvekst for fisk etter IP vaksinering.



### *Oppsummering av antistoffrespons*

Resultatene viste klare forskjeller i respons mellom vaksinerte grupper og PBS-grupper, og det ble registrert høyest respons mot de to gruppene av *A. salmonicida*. Respons mot *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa* var til sammenligning mye lavere, og målingene var så ujevne at det var vanskelig å sammenligne utviklingen av respons over tid. De lave verdiene ble vist uavhengig av forskjeller i vaksiner eller injeksjonsmetoder. Resultatene fra individ-serum viste ingen signifikant forskjell mellom vaksinerte grupper eller forskjellige injeksjonsmetoder, mot *V. anguillarum* O1 eller *M. viscosa*.

Resultatene fra serum-pools, for plateoppsett 1-2, viste lavere respons for V1-grupper enn for V2-grupper, mot *A. salmonicida* gr. 5 og 6. Resultatene for plateoppsett 3-4 viste tilsvarende forskjeller mellom V1 og V2. Det ble her vist en mulig økt respons for V1 ved IP vaksiner, sammenlignet med IM vaksiner. For V2-grupper ble det ikke vist noen klare forskjeller for respons ved forskjellige injeksjonsmetoder.

Resultatene fra individ-serum, for plateoppsett 1-2, viste signifikant forskjell i respons for de forskjellige vaksinene. Responsen for V1-grupper ble vist vesentlig lavere enn for V2-grupper. Resultatene fra plateoppsett 3-4 viste ingen signifikante forskjeller i respons etter IM eller IP vaksiner. Disse resultatene bekrefter observasjonene som ble gjort for serum-pools, og de resultatene som ble registrert for prøver fra dag 42.

Selv om plateoppsett 3-4 viste at IM vaksiner med V2 gir like høy gjennomsnittlig respons som ved IP vaksiner med V2, ble det samtidig avdekket en variasjon innad i de vaksinerte gruppene. Det ble her vist en høyere variasjon i individuell respons etter IP vaksiner med V2, sammenlignet med IM vaksiner av den samme vaksinen.

Det var ikke mulig å gjennomføre lignende analyser for direkte V1 og V2 sammenligning innenfor forsøkets tidsrammer; dvs. analyser av individserum for å sammenligne enkeltverdier opp mot serum-pools. Dette bør gjennomføres ved en senere anledning.

### 5.3 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi ble benyttet for å detektere vaksinerester i histologiske snitt. Tverrsnitt av muskelceller fra ikke-immunisert IM-fisk fra dag 0, samt immunisert fisk fra uttak på dag 21 og dag 42, ble undersøkt. Tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1 resulterte i en tydelig rød farging på snittene, som kunne observeres gjennom mikroskopet.

Det ble påvist tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1, ved undersøkelse av snitt fra vaksinert fisk fra dag 21 og dag 42. Som en kontroll, ble snitt fra PBS-fisk fra de samme uttakene også undersøkt, og det ble her ikke påvist tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1.

Det var i utgangspunktet planlagt å benytte antistoff mot atypisk *A. salmonicida* i de immunhistokjemiske undersøkelsene, men våre samarbeidspartnere i Vaxxinova rakk ikke å få dette ferdig innenfor forsøkets tidsrammer. Av budsjettmessige årsaker ble det heller ikke bestilt inn antistoff fra andre leverandører. Planen om å ta med immunhistokjemi i forsøket, ble av overnevnte årsaker vurdert skrinlagt.

I siste liten ble det imidlertid funnet antistoff mot *V. anguillarum* O1 i fryseren på NFH. Dette viste seg å være rester fra et forsøk som ble gjennomført en gang tidlig på 90-tallet. Til alt hell, viste det seg at dette antistoffet fortsatt hadde funksjon, selv etter å ha vært frosset ned ved -20 °C i over 20 år.

Det er uvisst hvilken konsekvens antistoffets oppbevaringstid og lagring har hatt på våre undersøkelser, men det er tvilsomt at disse faktorene har gitt en økning i respons. Man kan med andre ord gå ut fra at våre resultater, med påvist tilstedeværelse av *V. anguillarum* O1, skyldes faktiske forhold i våre prøver.

Det ville vært mest gunstig, om man i tillegg kunne gjennomført immunhistokjemi med et annet antigen. Dette ville gitt våre resultater for *V. anguillarum* O1, økt vitenskapelig tyngde. Oppgavens økonomiske og tidsmessige rammer, tillot imidlertid ikke dette.

## 5.4 Histologi

Histologiske undersøkelser ble gjennomført med den hensikt, å påvise eventuelle negative innvirkninger av vaksinerings hos IM-fisk. Forskjellige grader av inflammasjon i vevet, ble benyttet som indikator på negativ innvirkning. Totalt 267 snitt (3 snitt fra hver fisk), ble først evaluert av forsøksperson 1, før prøvene ble blindet. De samme prøvene ble så gitt til forsøksperson 2 og 3, for videre individuell vurdering.

Snittene ble i første omgang evaluert ut fra tilstedeværelse (+), eller ikke-tilstedeværelse (-) av inflammasjon. Resultatene fra undersøkelsen, viste en variasjon i gradering mellom forskjellige forsøkspersoner. Forsøksperson 1 ga høyere gjennomsnittlig gradering, enn forsøksperson 2 og 3. Dette skyldes mest sannsynlig at forsøksperson 1, evaluerte prøvene før blinding ble gjennomført.

Det ble deretter gjort et forsøk, på å etablere et system for gradering av vaksineskader i vevet. Flere alternative parametere for gradering ble vurdert: 1) antall affiserte celler (med vekt på inflammasjon og/eller nekrose), 2) omfang av vevsområde med inflammasjon og/eller nekrose (prosentandel av snitt og/eller lokalisering i snittet), 3) antall og/eller størrelse på granulomer eller granulom-liknende strukturer.

Bakdelen med alle disse parameterne, er at de vil kunne variere etter hvor- og hvordan snittene ble tatt. Da uttak av histologiske prøver ble gjennomført av forskjellige personer, er det tenkelig at forskjell i erfaring og metoder, vil kunne gi variasjon mellom snittene. Samtidig vil det være vanskelig for vaksinatør, å stikke fisken nøyaktig likt hver gang. Dette kan videre føre til økt variasjon mellom enkeltsnitt.

Gradering av vaksineskader i histologiske snitt, ble av overnevnte årsaker vurdert for komplisert til å gjennomføres på en faglig tilfredsstillende måte, innenfor forsøkets tidsrammer.

## 5.5 Konklusjoner

### *Velferdsindikatorer*

- Det ble vist redusert tilvekst for vaksinerte grupper, sammenlignet med PBS-grupper, men det ble ikke vist signifikante forskjeller mellom vaksinegruppene eller grupper vaksinert via forskjellige injeksjonsmetoder.
- Scoring ved Speilbergs skala viste signifikant høyere grad av adheranser for fisk vaksinert med V1, sammenlignet med fisk vaksinert med V2.
- Vaksinerings med V2, via IM injeksjon, resulterte i akutt gruppedødelighet på 30 % i løpet av 48 timer. Dette må anses som vesentlig høyere enn den totale dødeligheten på 6 % etter IM vaksinerings med V1.

### *Antistoffrespons*

- Det ble vist generelt lav respons mot *V. anguillarum* O1 og *M. viscosa*, for samtlige vaksinerte grupper. Resultatene fra individ-serum, viste ingen signifikante forskjeller mellom vaksinegrupper eller injeksjonsmetoder.
- Resultatene fra individ-serum, viste signifikant lavere respons mot de to gruppene av *A. salmonicida*, for fiskegrupper vaksinert med V1 sammenlignet med fiskegrupper vaksinert med V2.
- Det ble ikke vist signifikant forskjell mellom fiskegrupper vaksinert via forskjellige injeksjonsmetoder. Variasjon i individuell respons ble imidlertid vist høyere for fisk vaksinert via IP injeksjon, sammenlignet med fisk vaksinert via IM injeksjon.

### *Immunhistokjemi*

- *V. anguillarum* O1, som ble brukt som indikator for tilstedeværelse av vaksiner i histologiske snitt, ble detektert hos vaksinert fisk 21 og 42 dager etter vaksinerings.
- Samtidig ble det ikke detektert *V. anguillarum* O1 i noen av de undersøkte PBS-fiskene. Man kan dermed, med høy sannsynlighet, gå ut fra at histologiske forandringer hos vaksinert fisk, faktisk er forårsaket av vaksineringsen.

### *Histologi*

- Det ble vist histologiske forandringer i snitt fra vaksinerte fiskegrupper, og de første tydelige endringene ble observert i løpet av 48 timer etter vaksineringsen. Videre analyser kreves for å vise grad av inflammasjon i snittene, samt avdekke eventuelle forskjeller mellom vaksiner eller injeksjonsmetoder.

## **Hovedkonklusjoner**

Resultatene viste signifikant lavere respons etter vaksineringsen med V1, sammenlignet med vaksineringsen med V2. Våre resultater viser dermed lavere respons for den vegetabiliske olje-adjuvanten, sammenlignet med den mineralolje-baserte adjuvanten.

Samtidig ble det vist høy akutt gruppedødelighet etter IM vaksineringsen med V2, sammenlignet med fiskegrupper vaksinert med V1. Våre resultater indikerer dermed at vaksiner basert på adjuvanter av mineralolje, vil kunne gi økt fare for vesentlig helseskade hos rognkjeks etter IM injeksjon, eller ved feilstikk i muskel. Slike helseskader ble i langt mindre grad observert ved IM vaksineringsen med vegetabiliske olje-adjuvanter i vårt forsøk, noe som indikerer at denne typen adjuvanter kan virke mildere på rognkjeks.

Resultatene for IM og IP vaksinerte grupper ble ikke vist signifikant forskjellige, men variasjonen mellom lav- og høyrespondere ble vist størst for IP vaksinert fisk. Om dette utgjør redusert beskyttelse, må testes ved et senere smitteforsøk.

## Referanser

1. Statistisk sentralbyrå (2015). Akvakultur, 2014, foreløpige tall. [Hentet 30. mars 2016]. Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-forelopige/2015-06-02#content>.
2. Brudeseth BE, Wiulsrod R, Fredriksen BN, Lindmo K, Lokling KE, Bordevik M et al. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.*35(6): s. 1759-68.
3. Nærings- og fiskeridepartementet - via Lovdata. Paragraf 63 i forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften). [Hentet 30. april 2016]. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>.
4. Bakketeig IE, Hauge M, Kvamme C, Sunnset BH, Toft KØ (red.) (2016). Havforskningsrapporten 2016. Fisken og Havet, særnummer I-2016. Havforskningsinstituttet.
5. Burrige L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*,306 (2010)(1-4): s. 7-23.
6. Aaen SM, Helgesen KO, Bakke MJ, Kaur K, Horsberg TE (2015). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol.*31(2): s. 72-81.
7. Helgesen KO, Romstad H, Aaen SM, Horsberg TE (2015). First report of reduced sensitivity towards hydrogen peroxide found in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in Norway. *Aquaculture Reports* 1 (2015); s. 37-42.
8. Hjeltnes B, Walde CS, Jensen BB, Haukaas A (red.) (2016). Fiskehelserapporten 2015. Veterinærinstituttet.
9. Willumsen L et al. (2000). Fangst av rognkjeks (*Cyclopterus Lumpus* L.) og rognkjeks som lusespiser på laks. Gildeskål Forskningsstasjon AS.
10. Imsland AK, Reynolds P, Eliassen G, Hangstad TA, Foss A, Vikingstad E et al. (2013). The use of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) to control sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestations in intensively farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*.424-425 (2014); s. 18-23.
11. Imsland AK, Reynolds P, Eliassen G, Hangstad TA, Nytrø AV, Foss A et al. (2014). Notes on the behaviour of lumpfish in sea pens with and without Atlantic salmon present. *Journal of Ethology*.32(2): s. 117-22.
12. Skretting Norge AS og Norsk Oppdrettsservice AS. [Hentet 1. april 2016]. Tilgjengelig fra: <http://www.skretting.com/nb-NO/arter/rognkjeks/renefisk-malares/>.
13. Schaer M, Vestvik NF (Arctic Cleanerfish AS) (2012). Rognkjeks ABC - forberedelse og bruk av en lusespiser i laksemerd.
14. Kvenseth G, (Villa Organic) (2011). Leppefiskhistorie fra 1967 til 2010 – og ti år frem i tid! *Norsk Fiskeoppdrett* (2011) nr 6a; s. 12-14.

15. Espeland SH, Nedreaas KH, Mortensen SH, Skiftesvik AB, Agnalt A-L, Durif CM et al. (2010). Kunnskapsstatus leppefisk: Utfordringer i et økende fiskeri. Havforskningsinstituttet (2010).
16. Skiftesvik AAB, Opstad I, Kvenseth PG, Bjelland R (2011). Oppdrett av berggylte. Norsk Fiskeoppdrett (2011) nr 6a; s. 42-43.
17. Bornø G & Lie Linaker M (red.) (2015). Fiskehelse rapporten - 2014. Veterinærinstituttet (2015).
18. Svåsand T, Boxaspen KK, Karlsen Ø, Kvamme BO, Stien LH, Geir LT (red.) (2015). Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2014. Fisken og Havet, særnummer 2-2015, Havforskningsinstituttet.
19. Fiskeridirektoratet (2015). Statistikk for akvakultur 2014: s. 19-20.
20. FishBase: *Cyclopterus lumpus* Linnaeus. [Hentet 3. april 2016]. Tilgjengelig fra: <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=62&AT=lumpfish>.
21. Davenport J (1985). Synopsis of biological data on the lumpsucker, *Cyclopterus lumpus* (Linnaeus, 1758): Food & Agriculture Org (FAO). FAO rapport; Fisheries Synopsis; No. 147 (1985).
22. Veterinærinstituttet (2011). Rognkjeks som lusespiser? Et mulig nytt verktøy mot lus! Norsk Fiskeoppdrett, nr 1 (2011); s. 45-46.
23. Nilsen A, Viljugrein H, Røsæg MV, Colquhoun D (2014). Rensefiskhelse – kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker. Veterinærinstituttet; rapportserie · 12 – 2014.
24. Bornø G, Alarcón M, Linaker ML, Colquhoun D, Nilsen H et al. (2016). Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015. Veterinærinstituttet; rapportserie · 2 – 2016.
25. Abbas AK, Lichtman AH (2011). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd edition: s. 1-21 og 131-150: Elsevier Health Sciences (2011).
26. Press CM, Jørgensen TØ (1999). Fiskens immunsystem. Del 2 av: Fiskehelse og fiskesykdommer. Poppe T (red.). s. 37-47. Universitetsforlaget AS (1999).
27. Hansen JD, Zapata AG (1998). Lymphocyte development in fish and amphibians. Immunological Reviews. Volume 166; 1 (1998): s. 199-220.
28. Roberts RJ (red.) (2012). Fish pathology; Fourth edition: Kapittel 4 "The Immunology of Teleosts", s. 144-166: John Wiley & Sons (2012). [Hentet 30. april 2016]. Tilgjengelig fra: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118222942>.
29. 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. Journal of Immunology. 2005;174(11): s. 6608 - 6616.
30. Salinas I, Zhang Y-A, Sunyer JO (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. Developmental & Comparative Immunology. 2011;35(12): s. 1346-1365.

31. Bromage ES, Kaattari IM, Zwollo P, Kaattari SL (2014). Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *Journal of Immunology*. 2004;173(12): s. 7317 - 7323.
32. Haugland GT, Jakobsen RA, Vestvik N, Ulven K, Stokka L, Wergeland HI (2012). Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry. *PloS | one*. 2012;7(10):e47909.
33. Rønneseth A, Ghebretsaie DB, Wergeland HI, Haugland GT (2015). Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Developmental & Comparative Immunology*. 2015;52(2): s. 132 - 143.
34. Berg A, Bergh Ø, Fjellidal PG, Hansen T, Juell J-E, Nerland AH (2006). Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk - effekter og bivirkninger. *Fisken og havet*, nr. 9 (2006). Havforskningsinstituttet.
35. Gudding R (2014). Vaccination as a Preventive Measure. Chapter 2: Fish Vaccination. Gudding R., Lillehaug A., Evensen Ø (red.) (2014). Somerset, GB: Wiley-Blackwell (2014). [Hentet 26. april 2016]. Tilgjengelig fra: <http://site.ebrary.com/lib/tromsoub/docDetail.action?docID=10843888>.
36. Tafala C, Børgwald J, Dalmo RA, Munang'andu H, Evensen Ø (2014). Adjuvants in Fish Vaccines. Chapter 7: Fish Vaccination. Gudding R., Lillehaug A., Evensen Ø (red.) (2014). Somerset, GB: Wiley-Blackwell (2014).
37. Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 1996;6(5): s. 335-350.
38. Bruno D, Noguera PA, Poppe TT (2013). A colour atlas of salmonid diseases. Chapter 10: Production Diseases and Other Disorders. Springer Science & Business Media (2013); s. 151-178
39. Johansen L-H, Colquhoun DJ, Hansen H, Hildre S, Wergeland HI, Mikalsen HE (2016). Analyse av sykdomsrelatert risiko forbundet med bruk av villfanget og oppdrettet rensefisk for kontroll av lakselus. Nofima: Rapport 9/2016. Utgitt februar 2016.
40. Statens Legemiddelverk. Autogene vaksiner. [Hentet 27. april 2016]. Tilgjengelig fra: <http://www.legemiddelverket.no/Veterinaermedisin/preparater uten MT/Autogene-vaksiner/Sider/default.aspx>.
41. Anderson RM, May RM (1985). Vaccination and herd immunity. *Nature* (1985); s. 318:28.
42. PHARMAQ AS. Pakningsvedlegg; ALPHA MARINE micro 4, injeksjonsvæske, emulsjon. Vaksine til rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) [Hentet 27. april 2016]. Tilgjengelig fra: [http://www.pharmaq.no/sfiles/3/97/7/file/alpha-marine-micro-4\\_no\\_pil\\_sg\\_2014-5internal.pdf](http://www.pharmaq.no/sfiles/3/97/7/file/alpha-marine-micro-4_no_pil_sg_2014-5internal.pdf).



43. PHARMAQ AS. Pakningsvedlegg; AMARINE micro 4-2, injeksjonsvæske, emulsjon. Vaksine til rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) [Hentet 27. april 2016]. Tilgjengelig fra: [http://www.pharmaq.no/sfiles/1/31/5/file/2015-10\\_amarine-micro-4-2-no\\_pil\\_sg\\_internal.pdf](http://www.pharmaq.no/sfiles/1/31/5/file/2015-10_amarine-micro-4-2-no_pil_sg_internal.pdf).
44. Poppe TT, Taksdal T, Skjelstad H, Sviland C, Vågnes Ø et al. (2012). Nye arter – nye diagnostiske utfordringer. Norsk Veterinærtidsskrift (nr. 1/2012): s. 19-21.
45. Poppe TT, Binde M, Skrudland A, Johnsen S (2014). Fiskevelferden som forsvant. Norsk Veterinærtidsskrift, nr. 5 (2014): s. 485-7.
46. Erkinharju T, Persson D, Røsæg MV, (2013). Rensefisk - en forbruksvare. Norsk Veterinærtidsskrift, nr 1 (2013): s. 20-22.
47. Poppe TT, Colquhoun DJ, Taksdal T, Nilsen H, Alarcón M (2013). Rognkjeks i oppdrett – diagnostiske og dyrevelferdsmessige utfordringer. Norsk Veterinærtidsskrift, nr 9 (2013): s. 556-558.
48. Gulla S, Lund V, Kristoffersen A, Sørnum H, Colquhoun D (2015). vapA (A - layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. Journal of Fish Diseases. 2015.
49. Gulla S, Duodu S, Nilsen A, Fossen I, Colquhoun D (2015). *Aeromonas salmonicida* infection levels in pre - and post - stocked cleaner fish assessed by culture and an amended qPCR assay. Journal of Fish Diseases. 2015.
50. PHARMAQ AS (2016). VAKSINEMANUAL TIL ROGNKJEKS. Versjon 01 - 2016.
51. Mortensen A, Puvanendran V, Hansen ØJ (2013). Fysisk merking av oppdrettslaks. Test og evaluering av forskjellige merkemetoder. Nofima; rapportserie: s. 27. Nofima, 2013.
52. Veterinærinstituttet (2003). Kultiveringsveilederen. Avsnitt 4.6.8: Visible Implant Tags – VI merker. Publisert på vetinst.no 20.01.03. [Hentet 15. oktober 2015]. Tilgjengelig fra: <http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Vill-laksefisk/Kultiveringsveilederen>
53. Northwest Marine Technology Inc., (2008). Visible Implant Elastomer Tag. Project Manual.
54. Iversen MH, Jakobsen R, Eliassen RA, Ottesen O (2015). Sedasjon av berggyllt og rognkjeks for å redusere stress og dødelighet. Norsk Fiskeoppdrett 2015; Volum NFexpert. s. 42-46.
55. Landbruks- og matdepartementet - via Lovdata. Lov om dyrevelferd (dyrevelferdsloven). Paragraf 12. [Hentet 29. april 2016]. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-97>.
56. Veterinærinstituttet (2011). Kultiveringsveilederen. Avsnitt 4.8.6: Avliving av fisk. Publisert på vetinst.no 13.01.11. [Hentet 15. oktober 2015]. Tilgjengelig fra: <http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Vill-laksefisk/Kultiveringsveilederen>

57. Spaho E, Papa L, Sallaku E, Gjurgji F (2013). The assessment of some performance and welfare indicators in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), reared under two different feeding practices. *Albanian Journal of Agricultural Sciences* (2013);12(1): s. 103-109.
58. Waagbø R, Espe M, Hamre K, Lie Ø (red.) (2001). *Fiskeernæring*. Kapittel 14: Ernæring og helse; s. 235-258: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS (2001).
59. Waagbø R, Espe M, Hamre K, Lie Ø (red.) (2001). *Fiskeernæring*. Kapittel 12: Vekst og fôrutnyttelse; s. 205-217: Kystnæringen Forlag & Bokklubb AS (2001).
60. Gan SD, Patel KR (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology* (2013);133(9): s. 1-3.
61. Ramos-Vara J, Miller M (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry - The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology Online* (2014); 51(1): s. 42-87.
62. Løvås GG. *Statistikk for universiteter og høyskoler*: Universitetsforlaget; 2013.
63. Aunsmo A, Larssen RB, Valle PS, Sandberg M, Evensen Ø, Midtlyng PJ et al. (2008). Improved field trial methodology for quantifying vaccination side-effects in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 2008;284(1): s. 19-24.
64. Melingen GO, Wergeland HI (2002). Physiological effects of an oil-adjuvanted vaccine on out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. *Aquaculture* (2002); 214(1): s. 397-409.
65. Rønsholdt B, McLean E (1999). The effect of vaccination and vaccine components upon short-term growth and feed conversion efficiency in rainbow trout. *Aquaculture* (1999); 174(3): s. 213-21.
66. Pylkko P, Lyytikäinen T, Ritola O, Pelkonen S (2000). Vaccination influences growth of Arctic charr. *Diseases of Aquatic Organisms* (2000); 43(1): s. 77-80.
67. Koskela J, Rahkonen R, Pasternack M, Knuutinen H (2004). Effect of immunization with two commercial vaccines on feed intake, growth, and lysozyme activity in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture* (2004); 234(1): s. 41-50.
68. Ingilæ M, Arnesen JA, Lund V, Eggset G (2000). Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* (2000); 183(1): s. 31-44.
69. Bjørge MH, Nordgreen J, Janczak AM, Poppe T, Ranheim B, Horsberg TE (2011). Behavioural changes following intraperitoneal vaccination in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Applied Animal Behaviour Science* (2011); 133(1): s. 127-35.
70. Poppe TT, Koppang EO (2014). Side - Effects of Vaccination. Chapter 13: Fish Vaccination. Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø (red) (2014). Somerset, GB: Wiley-Blackwell (2014); s. 153-61.
71. Berg A, Rødseth OM, 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*. Vol 69 (2006): p 239-248. 2006.

72. Lillehaug A (2014). Vaccination strategies and procedures. Chapter 12: Fish Vaccination. Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø (red) (2014). Somerset, GB: Wiley-Blackwell (2014); s. 140-52.
73. Treasurer J, Cox C (2008). Intraperitoneal and dorsal median sinus vaccination effects on growth, immune response, and reproductive potential in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture* (2008); 275(1): s. 51-57.
74. Poppe TT, Breck O (1997). Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms*. Vol 29 (1997); s. 219-226.
75. Mutoloki S, Alexandersen S, Gravningen K, Evensen Ø (2008). Time-course study of injection site inflammatory reactions following intraperitoneal injection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with oil-adjuvanted vaccines. *Fish & shellfish immunology* (2008); 24(4): s. 386-93.
76. Koppang E, Haugarvoll E, Hordvik I, Aune L, Poppe T (2005). Vaccine - associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *Journal of Fish Diseases* (2005); 28(1): s. 13-22.
77. Erkinharju T, Knappskog DH, Vågnes ØB, Isdal E, Dalmo RA, Seternes T (2015). Temperature dependent immune response in atlantic lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.)
78. Maira C, Lystad Y, Schrøder MB, Lund V, Gudmundsdottir B (2016). Side effects of injectable vaccines in cod - Adapting the side-effect scale to cod [Hentet 12. mai 2016]. Tilgjengelig fra: [http://www.pharmaq.no/sfiles/31/8/file/side effects of injectable vaccines in cod kyst s57-61.pdf](http://www.pharmaq.no/sfiles/31/8/file/side%20effects%20of%20injectable%20vaccines%20in%20cod%20kyst%20s57-61.pdf).
79. Lillehaug A (1989). A survey on different procedures used for vaccinating salmonids against vibriosis in Norwegian fish-farming. *Aquaculture* (1989); 83(3): s. 217-26.
80. Koppang EO, Bjerkås I, Haugarvoll E, Chan EK, Szabo NJ, Ono N et al. (2008). Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *The Journal of Immunology* (2008); 181(7): s. 4807 - 4814.
81. Satoh M, Bjerkås I, Haugarvoll E, Chan EK, Szabo NJ, Jirillo E et al. (2011). Polyclonal hypergammaglobulinemia and autoantibody production induced by vaccination in farmed Atlantic salmon. *Fish & shellfish immunology* (2011); 30(4): s. 1080 - 1086.
82. Haugarvoll E, Bjerkås I, Szabo NJ, Satoh M, Koppang EO (2010). Manifestations of systemic autoimmunity in vaccinated salmon. *Vaccine* (2010); 28(31): s. 4961-4969.
83. PHARMAQ AS. "Vaksinerings av rognkjeks!" Presentasjon på seminar om rognkjeks i Tromsø (2014).
84. Midtlyng PJ (2014). Vaccination against Furunculosis. Chapter 16: Fish Vaccination. Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø (red) (2014). Somerset, GB: Wiley-Blackwell (2014); s. 185-199.

85. Lund V, Børdal S, Kjellsen O, Mikkelsen H, Schrøder MB (2006). Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Developmental & Comparative Immunology* (2006); 30(12): s. 1145-1155.
86. Schrøder MB, Ellingsen T, Mikkelsen H, Norderhus EA, Lund V (2009). Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish & shellfish immunology* (2009); 27(2): s. 112-119.
87. Lund V, Arnesen JA, Mikkelsen H, Gravningen K, Brown L, Schrøder MB (2008). Atypical furunculosis vaccines for Atlantic cod (*Gadus morhua*); vaccine efficacy and antibody responses. *Vaccine* (2008); 26(52): s. 6791-6799.
88. Biering E, Vaagnes Ø, Krossøy B, Gulla S, Colquhoun D (2016). Challenge models for atypical *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* in farmed Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and preliminary testing of a trial vaccine against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* (2016).
89. Dawit BG (2015). Adaptive Humoral Immune Response in Lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L.: Masteroppgave i Havbruksbiologi ved Universitetet i Bergen (2015).
90. Colquhoun DJ, Lillehaug A (2014). Vaccination against Vibriosis. Chapter 15: Fish Vaccination Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø (red.) (2014). Somerset, GB: Wiley-Blackwell (2014); s. 185-199.
91. Haugland Ø, Torgersen J, Syed M, Evensen Ø (2005). Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination. *Vaccine* (2005); 23(48): s. 5488-5499.
92. Stone HD. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza. *Avian Diseases* (1993): s. 399-405.
93. Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS (2011). Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine* (2011); 29(51): s. 9563 - 9572.

## Appendiks

- Appendiks I:** Liste over reagenser og produsenter
- Appendiks II:** Vekt-data for IM- og IP-grupper
- Appendiks III:** Scoring av vaksinebivirkninger for IP-grupper
- Appendiks IV:** ELISA – oversikt over plateoppsett  
ELISA - resultater fra HC-plater og uredigerte grafer fra US-plater
- Appendiks V:** Histologi – individuelle resultater fra scoring av histologiske snitt

## Appendiks I

**Tabell A1: Liste over reagenser og produsenter.**

<b>Reagenser</b>	<b>Produsenter</b>
Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Tablets	Sigma-Aldrich Co.
Anti-Rabbit IgG – Alkaline Phosphatase antibody	Sigma-Aldrich Co.
DH2O fra Milli-Q® Direct Water Purification System	Merck Millipore Co.
Etanol (96 %, puriss)	Sigma-Aldrich Co.
Etanol (≥ 99,8, absolutt, puriss)	Sigma-Aldrich Co.
Eukitt® quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich Co.
Finquel vet. (100% Trikainmesilat)	Western Chemical Inc.
Formaldehyd-løsning (≥ 34,5 %)	Sigma-Aldrich Co.
Fosfatbufret saltvann (PBS) fra NFH	NFH
Glysin	Sigma Aldrich Co.
HistoClear™	National Diagnostics Inc.
ImmunoHistoMount™	Sigma-Aldrich Co.
Kanin-anti-rognkjeks IgM	Professor Ivar Hordvik - UiB
Kanin-anti-Vibrio anguillarum O1	FORUT*
Magnesiumklorid (MgCl <sub>2</sub> )	Avantor Performance Materials Inc.
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck Inc.
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck Inc.
Natriumkarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck Inc.
Paraffin Histowax®	Histolab Products AB
Poly-L-lysin (0,1 %) løsning (PLL)	Sigma Aldrich Co.
RNA-later	Thermo Fisher Scientific Inc.
Saltsyre (HCL)	Merck Inc.
Shandon instant Hematoxylin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Shandon instant Eosin	Thermo Fisher Scientific Inc.
SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets	Sigma-Aldrich Co.
Sinkklorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck Inc.
Tris-bufret saltvann (TBS) fra NFH	NFH

\* Forskningsstiftelsen ved Universitetet i Tromsø (FORUT).

## Appendiks II

**Tabell A2: Gjennomsnittsvekt for IM-grupper ± standardavvik.**

Antall fisk (n) pr. gruppe: dag 0 (n=62), 1 time – dag 14 og dag 28 (n=4), dag 21 og 42 (n=10), dag 84 (n=2 for V1, n=4 for V2 og n=5 for PBS).

IM-grupper			
	PBS	V1	V2
Dag 0	16,51 ± 5,06	16,04 ± 4,86	17,08 ± 9,02
1 time	19,82 ± 3,96	13,21 ± 2,31	13,30 ± 2,59
4 timer	14,67 ± 1,51	15,38 ± 4,03	19,5 ± 5,06
24 timer	17,01 ± 5,4	21,91 ± 4,44	20,36 ± 5,12
48 timer	18,76 ± 5,20	17,96 ± 5,34	20,73 ± 8,20
Dag 4	17,82 ± 3,74	21,43 ± 9,55	12,35 ± 2,43
Dag 7	18,29 ± 5,27	19,16 ± 3,07	16,22 ± 2,31
Dag 14	21,68 ± 7,62	28,23 ± 15,68	ikke målt
Dag 21	30,94 ± 7,52	29,83 ± 11,24	30,15 ± 8,92
Dag 28	39,8 ± 9,25	29,285 ± 4,14	ikke målt
Dag 42	62,25 ± 19,14	45,38 ± 15,52	45,22 ± 19,39
Dag 84	56,35 ± 11,10	34,10 ± 23,54	83,94 ± 22,97

**Tabell A3: Gjennomsnittsvekt for IP-grupper ± standardavvik.**

Antall fisk (n) pr. gruppe: dag 0 (n=25), dag 21 og 42 (n=10), dag 84 (n=5).

IP-grupper			
	PBS	V1	V2
Dag 0	14,90 ± 5,18	15,29 ± 4,09	14,71 ± 3,69
Dag 21	34,80 ± 12,61	21,98 ± 6,15	28,95 ± 9,76
Dag 42	48,50 ± 18,00	32,16 ± 12,73	39,07 ± 5,36
Dag 84	56,96 ± 31,38	57,55 ± 7,77	93,35 ± 14,71

**Tabell A2: Data for dødfisk i IM-grupper**

Oversikt over registrerte dødfisk i forsøket.

Dato	Gruppe	Fisk nr.	Vekt (g)
19.10.2015	IM V2	1	18,02
19.10.2015	IM V2	2	21,51
19.10.2015	IM V2	3	15,16
19.10.2015	IM V2	4	11,39
19.10.2015	IM V2	5	12,82
19.10.2015	IM V2	6	13,28
19.10.2015	IM V2	7	9,97
19.10.2015	IM V2	8	10,52
19.10.2015	IM V2	9	15,79
19.10.2015	IM V2	10	9,95
20.10.2015	IM V1	1	14,61
20.10.2015	IM V1	2	11,1
20.10.2015	IM V2	3	11,73
20.10.2015	IM V2	4	17,45
20.10.2015	IM V2	5	9,08
20.10.2015	IM V2	6	10,83
21.10.2015	IM V1	1	26,52
21.10.2015	IM V2	2	26,64
21.12.2015	IM V1	1	ikke målt



**Appendiks III**

**Tabell A4: Scoring av vaksinebivirkninger for IP-grupper på dag 21.**

Adh (adheranser), lok 1-3 (lokalisering), mel O (melanin i organ),  
mel M (melanin i bukvegg/muskel), vaks (vaksinerester).

Uttak	Gruppe	Fisk nr.	Vekt (g)	Adh	Lok 1	Lok 2	Lok 3	Mel O	Mel M	Vaks
21d	V1	1	21,13	2	x	x	x	0	0	3
	V1	2	31,65	2		x	x	0	0	1
	V1	3	23,29	4	x	x	x	0	0	1
	V1	4	13,53	3	x	x	x	0	0	2
	V1	5	14,52	4	x	x	x	0	0	2
	V1	6	27,71	3	x		x	0	0	2
	V1	7	15,1	4	x	x	x	0	0	2
	V1	8	23,73	4		x	x	0	0	3
	V1	9	27,76	4		x	x	0	0	2
	V1	10	21,34	4	x	x	x	0	0	2
Snitt			21,98	3,4				0	0	2
STD			6,15	0,84						0,67
21d	V2	1	16,76	2			x	0	0	1
	V2	2	22,81	2	x	x	x	0	0	1
	V2	3	19,22	1			x	0	0	1
	V2	4	25,93	3	x	x	x	0	0	1
	V2	5	47,83	2		x	x	0	0	0
	V2	6	30,81	3	x	x	x	0	0	1
	V2	7	24,35	3	x	x	x	0	0	0
	V2	8	42,52	3	x	x	x	0	0	1
	V2	9	28,79	4	x	x	x	0	0	0
	V2	10	30,47	3	x		x	0	0	1
Snitt			28,95	2,6				0	0	0,7
STD			9,76	0,84						0,48
21d	PBS	1	56,28	0				0	0	0
	PBS	2	36,13	0				0	0	0
	PBS	3	27,46	0				0	0	0
	PBS	4	53,81	0				0	0	0
	PBS	5	42,1	0				0	0	0
	PBS	6	36,17	0				0	0	0
	PBS	7	28,46	0				0	0	0
	PBS	8	22,08	0				0	0	0
	PBS	9	21,42	0				0	0	0
	PBS	10	24,04	0				0	0	0
Snitt		12,60678	34,80	0				0	0	0
STD			12,61	0,00						0,00

**Tabell A5: Scoring av vaksinebivirkninger for IP-grupper på dag 42.**

Adh (adheranser), lok 1-3 (lokalisering), mel O (melanin i organ),  
mel M (melanin i bukvegg/muskel), vaks (vaksinerester).

Uttak	Gruppe	Fisk nr.	Vekt (g)	Adh	Lok 1	Lok 2	Lok 3	Mel O	Mel M	Vaks
42d	V1	1	61,87	2		x	x	0	0	1
	V1	2	23,94	3	x	x	x	0	0	2
	V1	3	38,12	3		x	x	0	0	2
	V1	4	40,59	3		x	x	0	0	2
	V1	5	30,16	4	x	x	x	0	0	2
	V1	6	24,78	4	x	x	x	0	0	1
	V1	7	33,05	3	x	x	x	0	0	2
	V1	8	18,82	4	x	x	x	0	0	2
	V1	9	19,4	3	x	x	x	0	0	1
	V1	10	30,87	3	x	x	x	0	0	1
Snitt			32,16	3,2				0	0	1,6
STD			12,73	0,63						0,52
42d	V2	1	44,43	2		x	x	0	0	0
	V2	2	44,37	2	x	x	x	0	0	0
	V2	3	44,91	2	x	x	x	0	0	0
	V2	4	28,47	3	x	x	x	0	0	0
	V2	5	39,77	2	x	x	x	0	0	0
	V2	6	36,15	2	x	x	x	0	0	0
	V2	7	40,69	2	x	x	x	0	0	0
	V2	8	41,5	3	x	x	x	0	0	0
	V2	9	37,23	2	x	x	x	0	0	0
	V2	10	33,17	3	x	x	x	0	0	0
Snitt			39,07	2,3				0	0	0
STD			5,36	0,48						0,00
42d	PBS	1	58,6	0				0	0	0
	PBS	2	27,56	0				0	0	0
	PBS	3	67,13	0				0	0	0
	PBS	4	37,68	0				0	0	0
	PBS	5	36,12	0				0	0	0
	PBS	6	54,83	0				0	0	0
	PBS	7	38,13	0				0	0	0
	PBS	8	30,65	0				0	0	0
	PBS	9	84,42	0				0	0	0
	PBS	10	49,84	0				0	0	0
Snitt			48,50	0				0	0	0
STD			18,00	0,00						0,00

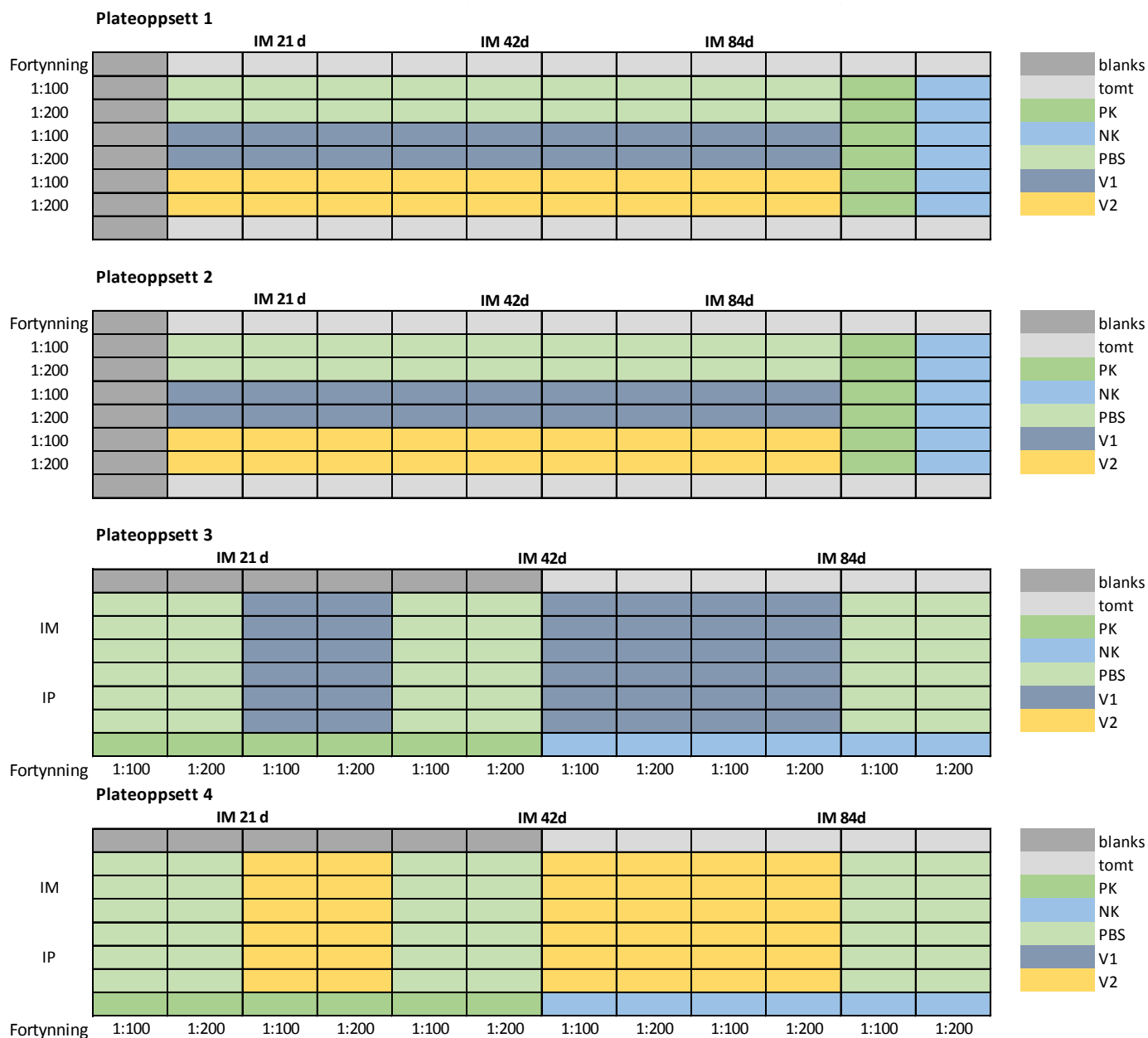
**Tabell A6: Scoring av vaksinebivirkninger for IP-grupper på dag 84.**

Adh (adheranser), lok 1-3 (lokalisering), mel O (melanin i organ),  
mel M (melanin i bukvegg/muskel), vaks (vaksinerester).

Uttak	Gruppe	Fisk nr.	Vekt (g)	Adh	Lok 1	Lok 2	Lok 3	Mel O	Mel M	Vaks
84 d	V1	1	59,8	5	x	x	x	0	0	0
	V1	2	50,13	5	x	x	x	0	0	1
	V1	3	77,37	4		x	x	0	0	0
	V1	4	37,87	6	x	x	x	0	0	1
	V1	5	62,6	6	x	x	x	0	0	0
Snitt			57,55	5,2				0	0	0,4
STD			14,71	0,84						0,55
84 d	V2	1	106,2	5	x	x	x	0	0	1
	V2	2	86,08	5	x	x	x	0	0	1
	V2	3	92,43	5	x	x	x	0	0	0
	V2	4	93,48	4	x	x	x	0	0	1
	V2	5	88,56	4	x	x	x	0	0	1
Snitt			93,35	4,6				0	0	0,8
STD			7,77	0,55						0,45
84 d	PBS	1	52,8	0				0	0	0
	PBS	2	107,36	0				0	0	0
	PBS	3	26,05	0				0	0	0
	PBS	4	36,86	0				0	0	0
	PBS	5	61,71	0				0	0	0
Snitt			56,96	0				0	0	0
STD			31,38	0,00						0,00

## Appendiks IV

### ELISA – oversikt over plateoppsett for serum-pools



## Appendiks

### ELISA – oversikt over plateoppsett for individ-serum







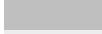
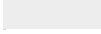
#### Plateoppsett 1-2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fisk 1			Fisk 9			Fisk 7		Fisk 5			
Fisk 2			Fisk 10			Fisk 8		Fisk 6			
Fisk 3			Fisk 1			Fisk 9		Fisk 7			
Fisk 4			Fisk 2			Fisk 10		Fisk 8			
Fisk 5			Fisk 3			Fisk 1		Fisk 9			
Fisk 6			Fisk 4			Fisk 2		Fisk 10			
Fisk 7			Fisk 5			Fisk 3		PK			
Fisk 8			Fisk 6			Fisk 4		Blank			

 PBS	 V1/V2	 V2/V1	 Positiv kontroll (PK)
			 Blank

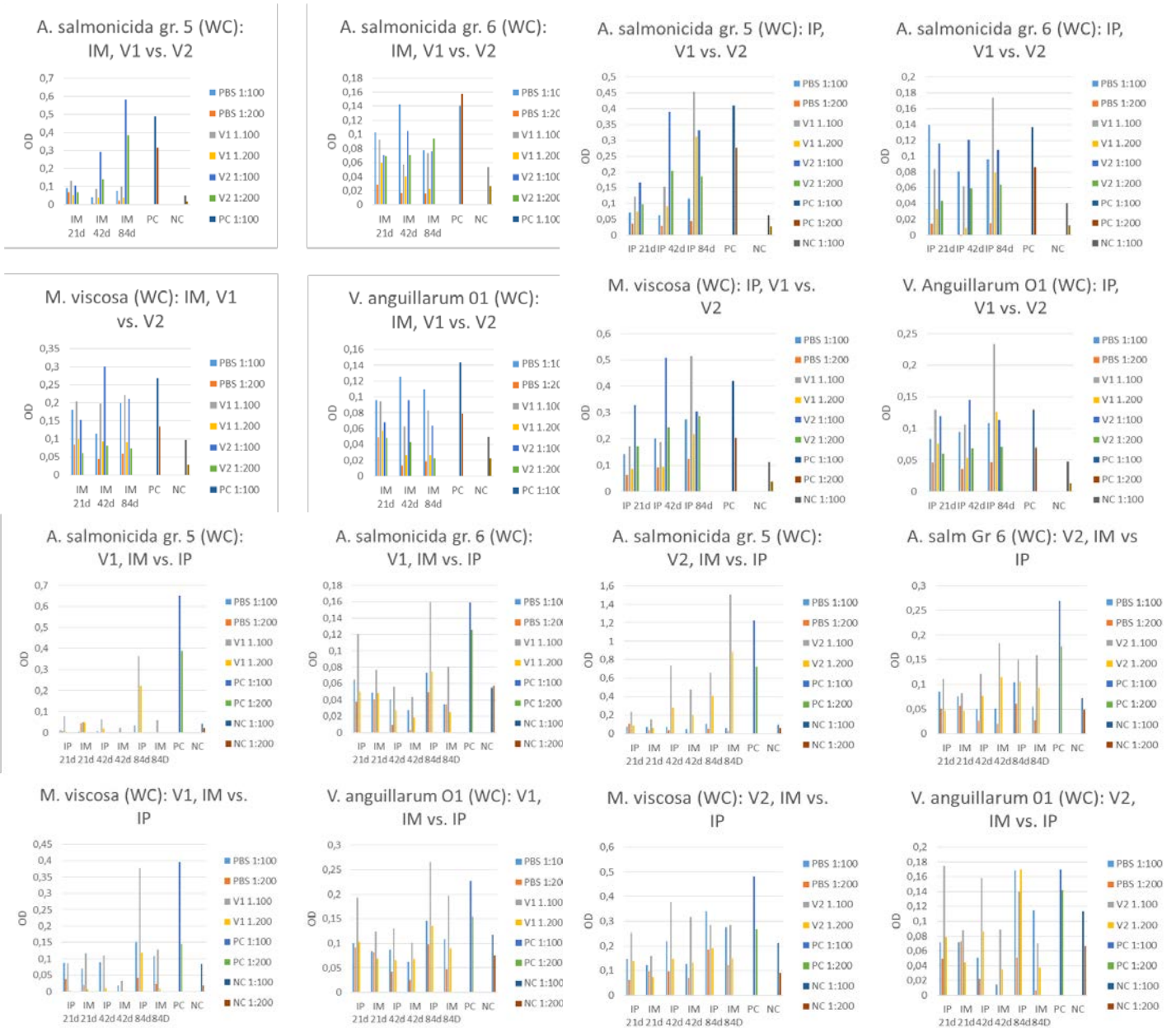
#### Plateoppsett 3-4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fisk 1	Fisk 9	Fisk 7	Fisk 5	Fisk 3						PK	
Fisk 2	Fisk 10	Fisk 8	Fisk 6	Fisk 4							
Fisk 3	Fisk 1	Fisk 9	Fisk 7	Fisk 5						DO	
Fisk 4	Fisk 2	Fisk 10	Fisk 8	Fisk 6							
Fisk 5	Fisk 3	Fisk 1	Fisk 9	Fisk 7						Blank	
Fisk 6	Fisk 4	Fisk 2	Fisk 10	Fisk 8							
Fisk 7	Fisk 5	Fisk 3	Fisk 1	Fisk 9							
Fisk 8	Fisk 6	Fisk 4	Fisk 2	Fisk 10							

 PBS IM	 PBS IP	 V1/V2 IM	 V1/V2 IP	 Positiv kontroll
				 Dag 0 pool
				 Blank (bare buffer)
				 Tom

# Appendiks

## ELISA – resultater fra HC-plater



# Appendiks

## ELISA – ikke-redigerte grafer fra US-plater



# Appendiks

## Appendiks V

### Histologi – individuelle resultater fra scoring av histologiske snitt

Scoring av forsøksperson 1						
Uttaks-tid	Admini	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	Score	
0t	Uvaksinert (kontroll)	F1		ikke evaluert		
		F2	-	-	+	
		F3	-	-	-	
		F4		ikke evaluert		
		F5		ikke evaluert		
Snittverdi						
1t	PBS	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3		ikke evaluert		
		F4		ikke evaluert		
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
4t	PBS	F1		ikke evaluert		
		F2		ikke evaluert		
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	ikke evaluert	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
24t	PBS	F1	-	-	-	
		F2		ikke evaluert		
		F3		ikke evaluert		
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
48t	PBS	F1		ikke evaluert		
		F2	-	-	-	
		F3		ikke evaluert		
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	-	
		F2	+	-	-	
		F3	-	-	+	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	+	+	-	
F3		-	+	-		
F4		-	-	+		
Snittverdi						

Scoring av forsøksperson 2						
Uttaks-tid	Admini	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	Score	
0t	Uvaksinert (kontroll)	F1		ikke evaluert		
		F2	-	-	+	
		F3	-	-	-	
		F4		ikke evaluert		
		F5		ikke evaluert		
Snittverdi						
1t	PBS	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3		ikke evaluert		
		F4		ikke evaluert		
	Snittverdi					
	V1	F1	?	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
4t	PBS	F1		ikke evaluert		
		F2		ikke evaluert		
		F3	-	?	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	-	-	+	
		F3	+	-	-	
		F4	-	+	?	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-/+		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
24t	PBS	F1	-	-	-	
		F2		ikke evaluert		
		F3		ikke evaluert		
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	+	-	
		F2	- (?)	-/+	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	+	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
48t	PBS	F1		ikke evaluert		
		F2	-	-	-	
		F3		ikke evaluert		
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	+	
		F2	+	+	-	
		F3	-/+	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	+	+	
		F2	+	- (?)	+	
F3		-	-	+		
F4		-	-	-		
Snittverdi						

Scoring av forsøksperson 3						
Uttaks-tid	Admini	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	Score	
0t	Uvaksinert (kontroll)	F1		ikke evaluert		
		F2	-	-	+	
		F3	-	-	-	
		F4		ikke evaluert		
		F5		ikke evaluert		
Snittverdi						
1t	PBS	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3		ikke evaluert		
		F4		ikke evaluert		
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
4t	PBS	F1		ikke evaluert		
		F2		ikke evaluert		
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	- (?)	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
24t	PBS	F1	-	-	-	
		F2		ikke evaluert		
		F3		ikke evaluert		
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	+	-	-	
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	-	-	
F3		-	-	-		
F4		-	-	-		
Snittverdi						
48t	PBS	F1		ikke evaluert		
		F2	-	-	-	
		F3		ikke evaluert		
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	-	
		F2	+	-	- (?)	
		F3	-	-	+	
		F4	-	-	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	- (?)	
		F2	- (?)	+	-	
F3		-	+	-		
F4		-	-	+		
Snittverdi						



# Appendiks

Scoring av forsøksperson 1

Uttaks-tid	Admini	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	Score	
4d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
		F3	+	+	+	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	-	
		F2	-	+	+	
F3		+	+	+		
F4		+	+	+		
Snittverdi						
7d	PBS	F1	-	-	-	
		F2	ikke evaluert			
		F3	-	-	+	
		F4	ikke evaluert			
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
		F3	+	+	-	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
F3		+	+	+		
F4		+	+	-		
Snittverdi						
14d	PBS	Ikke evaluert				
	V1	Ikke evaluert				
	V2	Ikke evaluert				
21d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	-	-	-	
		F3	ikke evaluert			
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	+	
		F2	+	+	-	
		F3	+	+	+	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
F3		+	+	+		
F4		+	+	+		
Snittverdi						
28d	PBS	Ikke evaluert				
	V1	Ikke evaluert				
	V2	Ikke evaluert				
42d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	+	+	+	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
		F3	+	+	+	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
F3		+	+	+		
F4		+	+	+		
Snittverdi						

Scoring av forsøksperson 2

Uttaks-tid	Admini	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	Score	
4d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	+	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	+	+	
		F2	-	+	+	
		F3	+	+	+	
		F4	+	+	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	-	-	
		F2	-	-	+	
F3		+	+	+		
F4		-	+	-		
Snittverdi						
7d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	-	-	-	
		F4	ikke evaluert			
	Snittverdi					
	V1	F1	+	-	-	
		F2	-	+	+	
		F3	+/-	+	+	
		F4	+	-	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	+	+	+	
F3		+	+	+		
F4		ikke evaluert	+	+		
Snittverdi						
14d	PBS	Ikke evaluert				
	V1	Ikke evaluert				
	V2	Ikke evaluert				
21d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	-	-	-	
		F3	ikke evaluert			
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	-	+	-	
		F2	-	+	+	
		F3	-(?)	+	+	
		F4	+	+	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	+	-	
		F2	+	+	+	
F3		+	+	+		
F4		+	+	+		
Snittverdi						
28d	PBS	Ikke evaluert				
	V1	Ikke evaluert				
	V2	Ikke evaluert				
42d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	-	-/+	-	
		F4	-	-	-(?)	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	-	-	
		F2	+	+	-	
		F3	+/-	+	+	
		F4	+	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	+	+	-	
F3		-	+	+		
F4		+/-	-	-		
Snittverdi						

Scoring av forsøksperson 3

Uttaks-tid	Admini	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	Score	
4d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	-(?)	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	-	
		F2	-	+	+	
		F3	+	+	+	
		F4	+	-	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	-	-	
		F2	-	+	-(?)	
F3		+	+	-		
F4		+	-	-(?)		
Snittverdi						
7d	PBS	F1	-	-	-	
		F2	ikke evaluert			
		F3	+	-	-	
		F4	ikke evaluert			
	Snittverdi					
	V1	F1	-	-	-	
		F2	+	+	-(?)	
		F3	-(?)	-	-	
		F4	-	+	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	+	+	
		F2	-	+	+	
F3		+	+	-		
F4		+	+	-		
Snittverdi						
14d	PBS	Ikke evaluert				
	V1	Ikke evaluert				
	V2	Ikke evaluert				
21d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	-	-	-	
		F3	ikke evaluert			
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	+	-	
		F2	-(?)	-	-(?)	
		F3	+	+	+	
		F4	+	+	-	
	Snittverdi					
	V2	F1	-	+	-	
		F2	+	+	-(?)	
F3		-(?)	+	-		
F4		+	+	+		
Snittverdi						
28d	PBS	Ikke evaluert				
	V1	Ikke evaluert				
	V2	Ikke evaluert				
42d	PBS	F1	ikke evaluert			
		F2	ikke evaluert			
		F3	-	-	-	
		F4	-	-	-	
	Snittverdi					
	V1	F1	+	-	-	
		F2	+	+	-	
		F3	-(?)	-	+	
		F4	-	-	+	
	Snittverdi					
	V2	F1	+	-(?)	+	
		F2	+	+	-	
F3		-	+	+		
F4		-	-	-		
Snittverdi						

## Appendiks

Scoring av forsøksperson 1

Dødfisk fra 19.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
19.10.2015	V2	F1	-	not	
	V2	F2	-	not	
	V2	F3	-	not	
	V2	F4	-	not	
	V2	F5	-	not	
	V2	F6	+	not	
	V2	F7	+	not	
	V2	F8	+	-	
	V2	F9	-	not	
	V2	F10	+	-	
Snittverdi					
Dødfisk fra 20.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
20.10.2015	V1	F1	-	-	
	V1	F2	-	+	
	Snittverdi				
	V2	F3	+	not	
	V2	F4	+	not	
	V2	F5	+	+	
V2	F6	+	not		
Snittverdi					
Dødfisk fra 21.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
21.10.2015	V1	F1	ikke evaluert	ikke evaluert	
	Snittverdi				
	V2	F2	ikke evaluert	ikke evaluert	
Snittverdi					

Scoring av forsøksperson 2

Dødfisk fra 19.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
19.10.2015	V2	F1	-	not	
	V2	F2	-	not	
	V2	F3	-	not	
	V2	F4	-	not	
	V2	F5	-	not	
	V2	F6	-	not	
	V2	F7	-	not	
	V2	F8	+	+/-	
	V2	F9	-	not	
	V2	F10	-	-	
Snittverdi					
Dødfisk fra 20.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
20.10.2015	V1	F1	-	-	
	V1	F2	-(?)	-(?)	
	Snittverdi				
	V2	F3	-	not	
	V2	F4	-	not	
	V2	F5	-	-	
V2	F6	-	not		
Snittverdi					
Dødfisk fra 21.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
21.10.2015	V1	F1	ikke evaluert	ikke evaluert	
	Snittverdi				
	V2	F2	ikke evaluert	ikke evaluert	
Snittverdi					

Scoring av forsøksperson 3

Dødfisk fra 19.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
19.10.2015	V2	F1	-	not	
	V2	F2	-	not	
	V2	F3	-	not	
	V2	F4	-	not	
	V2	F5	-	not	
	V2	F6	-	not	
	V2	F7	-	not	
	V2	F8	-(?)	-	
	V2	F9	-	not	
	V2	F10	-	-	
Snittverdi					
Dødfisk fra 20.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
20.10.2015	V1	F1	-(?)	-	
	V1	F2	-	-	
	Snittverdi				
	V2	F3	-	not	
	V2	F4	-	not	
	V2	F5	-	-(?)	
V2	F6	-	not		
Snittverdi					
Dødfisk fra 21.10.15					
Uttakstid	Øministre	Fisk nr.	Score snitt 1	Score snitt 2	
21.10.2015	V1	F1	ikke evaluert	ikke evaluert	
	Snittverdi				
	V2	F2	ikke evaluert	ikke evaluert	
Snittverdi					