

Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk – effekter og bivirkninger

Animal welfare and fish vaccination – effects and side-effects

Arne Berg, Øivind Bergh, Per Gunnar Fjelldal, Tom Hansen, Jon Erik Juell og Audun Nerland



Utredning til Mattilsynet
Fisken og havet nr. 9 - 2006

**DYREVELFERDSMESSIGE KONSEKVENSER AV
VAKSINASJON AV FISK – EFFEKTER OG BIVIRKNINGER**
Animal welfare and fish vaccination – effects and side-effects

Av:
Arne Berg, Øivind Bergh, Per Gunnar Fjelldal, Tom Hansen, Jon Erik Juell og
Audun Nerland

PROSJEKTRAPPORT



Nordnesgaten 50, Postboks 1870 Nordnes, 5817 BERGEN
Tlf. 55 23 85 00, Fax 55 23 85 31, www.imr.no

Tromsø	Flødevigen	Austevoll	Matre
9294 TROMSØ	4817 HIS	5392 STOREBØ	5984 MATREDAL
Tlf. 55 23 85 00	Tlf. 37 05 90 00	Tlf. 55 23 85 00	Tlf. 55 23 85 00
Fax 77 60 97 01	Fax 37 05 90 01	Fax 56 18 22 22	Fax 56 36 75 85

Rapport: FISKEN OG HAVET	Nr. - År 9 - 2006
Tittel (norsk/engelsk): Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk - effekter og bivirkninger	
Forfatter(e): A.Berg, Ø.Bergh, P.G. Fjelldal T.Hansen, J.E. Juell, A. Nerland	

Distribusjon: Åpen
HI-prosjektnr.: 99417
Oppdragsgiver(e): Mattilsynet, FKD
Oppdragsgivers referanse:
Dato: 31.10.2006
Program: Rådgivningsprogram akvakultur
Forskningsgruppe: Fiskehelse
Antall sider totalt: 43

Sammendrag (norsk):

Moderne industrielt fiskeoppdrett, slik det drives på laks og regnbueørret i Norge, ville ikke vært mulig uten vaksinasjon mot enkelte sykdommer. Dels ville økt forekomst av sykdom skapt uakseptabel dyrevelferd, dels ville behandling med antibiotika hatt uakseptable miljøvirkninger, og dels ville summen av disse faktorene ødelagt økonomien i oppdrettet. Det fins flere ulike virkninger av vaksinasjon, både immunreaksjoner og sammenvoksninger, melanindeponering, effekter på vekst og skjelettdeformasjoner. Ulike faktorer som kan påvirke utvikling av bivirkninger blir drøftet. Selv om det meste av oppdrettsfisken synes å ha bivirkninger som er innenfor rammen av det akseptable – er det bekymringsfullt at en viss andel av fisken har uakseptable skader

Summary (English):

Modern industrial aquaculture, as salmon and rainbow trout farming in Norway, would have been impossible without vaccination against certain diseases. Firstly, increased numbers of disease incidences would have caused unacceptable animal welfare, secondly antibacterial treatment would have destroyed the economical basis for aquaculture. There are several different effects of vaccination, such as immune reactions and adhesions, melanin deposits, effects on growth and skeletal deformations. Different factors that may influence development of deformities are discussed. The majority of the fish, but not all, possess side effects within acceptable limits.

Emneord (norsk): 1. Vaksiner 2. Bivirkninger 3. Dyrevelferd	Subject heading (English): 1. Vaccines 2. Side-effects 3. Animal welfare
---	--

.....
prosjektleder

.....
forskingsgruppeleder

INNHOOLD

<i>Sammendrag</i>	4
<i>English summary</i>	4
<i>Innledning</i>	5
<i>Vaksinasjon og fiskevelferd</i>	6
<i>Velferdsindikatorer</i>	7
<i>Beskyttelse og redusert sykkelighet</i>	9
<i>Bivirkninger av vaksinasjon i bukhulen</i>	9
<i>Vaksinasjon og immunsystemet til fisk</i>	10
<i>Vaksinetyper til fisk</i>	11
<i>Effekt av vaksinasjonsmetoder på fisk</i>	14
<i>Bivirkninger av vaksinasjon</i>	16
<i>Immunreaksjoner og sammenvoksninger</i>	16
<i>Melanindeponering</i>	18
<i>Påvirkning av vekst</i>	19
<i>Skjelettdeformasjoner</i>	21
<i>Faktorer som kan påvirke utvikling av bivirkninger</i>	26
<i>Temperatur</i>	26
<i>Fiskestørrelse</i>	28
<i>Andre biologiske og miljømessige faktorer</i>	29
<i>Vaksinasjonsteknologi</i>	29
<i>Vaksinesammensetning</i>	29
<i>Konklusjon</i>	29
<i>Referanser</i>	30
<i>Vedlegg 1 Skjult melanin i filet</i>	34
<i>Vedlegg 2 Vaksinasjonsforsøk høstsmolt</i>	40

SAMMENDRAG

Moderne industrielt fiskeoppdrett, slik det drives på laks og regnbueørret i Norge, ville ikke vært mulig uten vaksinasjon mot enkelte sykdommer. Dels ville økt forekomst av sykdom skapt uakseptabel dyrevelferd, dels ville behandling med antibiotika hatt uakseptable miljøvirkninger, og dels ville summen av disse faktorene ødelagt økonomien i oppdrettet. Det fins flere ulike virkninger av vaksinasjon, både immunreaksjoner og sammenvoksninger, melanindeponering, effekter på vekst og skjelettdeformasjoner. Ulike faktorer som kan påvirke utvikling av bivirkninger blir drøftet. Selv om det meste av oppdrettsfisken synes å ha bivirkninger som er innenfor rammen av det akseptable – fordelene med vaksinasjon tatt i betraktning – er det bekymringsfullt at en viss andel av fisken synes å ha disse bivirkningene i uakseptabel grad. Sammenvoksninger og skjelettdeformasjoner er antakelig de bivirkningene som i størst grad har etiske og dyrevelferdsmessige implikasjoner.

Det er store variasjoner mellom ulike fiskearter, både med hensyn til generell biologi, immunforsvar og den oppdrettsteknologien som er aktuell. Data fra laks kan ikke uten videre overføres til torsk og kveite, men det er klart at vaksinasjon er nødvendig for disse artene i oppdrett, samtidig som det også her må forventes bivirkninger ved vaksinasjon.

Nye vaksinekonsepter som rekombinante vaksiner basert på genomikk/proteomikk kan gi bedre beskyttelse og vesentlig lavere bivirkninger hvis det tas i bruk i fremtiden. Det samme gjelder såkalt DNA-vaksinasjon. Eventuelle livssynsmessige eller andre politiske føringer mot bruk av slik teknologi bør vektas mot dyrevelferdsmessige, miljømessige og økonomiske hensyn.

ENGLISH SUMMARY

Modern industrial aquaculture, as salmon and rainbow trout farming in Norway, would have been impossible without vaccination against certain diseases. Firstly, increased numbers of disease incidences would have caused unacceptable animal welfare, secondly antibacterial treatment would have caused unacceptable environmental effects, and thirdly the sum of these factors would have destroyed the economical basis for aquaculture. There are several different effects of vaccination, such as immune reactions and adherations, melanin deposits, effects on growth and skeletal deformations. Different factors that may influence development of deformities are discussed. Although the majority of the farmed fish seems to possess side-effects within acceptable limits – given the pros of vaccination – it is evident that some fish possess unacceptable levels of side effects. Adherations and skeletal deformations are probably the side effects with the most important implications to animal welfare and ethics.

Major variations exist among different fish species, with respect to general biology, immune systems, and aquaculture technology. Results from salmonids cannot necessarily be transferred to cod or halibut, but it seems evident that vaccination is necessary in aquaculture of these species, and that side effects must be expected.

New vaccine concepts, such as recombinant vaccines based on genomics/proteomics may give better protection and considerably less side effects, if development and utilisation is allowed to proceed. The same applies to DNA vaccination. Religious or political objections to new vaccine technologies must be weighed against concerns for animal welfare, environmental and economical factors.

INNLEDNING

Den voldsomme veksten i norsk havbruksnæring hadde ikke vært mulig uten vaksinasjon. Oppdrettsnæringen hadde svært alvorlige sykdomsproblemer i perioden fra midten av åttitallet fram til 1992. I hovedsak skyldtes dette epidemier av de to bakterielle infeksjonssykdommene kaldtvannsvibriose (også kalt "Hitrasyke") og furunkulose. De økonomiske konsekvensene var store, ikke bare for oppdretterne selv, men også for samfunnet rundt. Før effektive vaksiner ble tilgjengelige var terapeutisk behandling med antibiotika eneste mulighet til bekjempelse. Antibiotikaforbruket til fisk i Norge på årsbasis nådde toppen i 1987, da omtrent 50 tonn ble brukt. I ettertid er det lett å se at disse to epidemiene forårsaket et "image"-problem som næringen fortsatt sliter med. Det er helt usannsynlig at oppdrettsnæringen ville ha kunnet fortsette uten vaksinasjon over særlig lang tid.

Vaksinasjon av fisk er mulig av samme årsak som vaksinasjon av mennesker og andre pattedyr er mulig. Vesentlige komponenter i immunforsvaret viser en viss grad av likhet (og slektskap) mellom ulike grupper av virveldyr. I praksis er vaksinasjon som sykdomsforebyggende konsept begrenset til virveldyrene. Selv om det finnes internasjonale publikasjoner om "vaksinasjon" av reker der en viss sykdomsforebyggende effekt blir demonstrert, er det grunn til å tro at det er mer tale om uspesifikk immunstimulering enn egentlig vaksinasjon. Virvelløse dyr som er aktuell for oppdrett i Norge, som skjell og hummer, kan etter det vi i dag vet ikke vaksineres, og faller derfor utenfor denne rapporten.

Vaksinasjon bygger på at den spesifikke delen av fiskens immunforsvar blir stimulert ved at den utsettes for såkalte antigener fra den organismen man vaksinerer mot. Prosessen som startes i fisken kalles en immunrespons, og består i at fiskens immunforsvar produserer antistoffer mot antigenene den er utsatt for. Ved senere eksponering for antigenene vil fisken kunne "kjenne igjen" den "fiendtlige inntrengeren. Enkle vaksiner består av drepte eller svekkede mikroorganismer. Vaksinen som i sin tid brakte kaldtvannsvibriosen under kontroll, består av formalindrepte bakterier av typen *Vibrio salmonicida*, opprinnelig isolert og karakterisert av forsker Emmy Egidius og kolleger ved Havforskningsinstituttet. Vaksinen er fortsatt i bruk, og er helt nødvendig for å unngå at sykdommen bryter ut på ny i lakseoppdrett. Mer avanserte vaksinekonsepter som f.eks. de eksperimentelle vaksinene som Havforskningsinstituttet nå tester mot lakselus, bygger på rekombinant DNA-teknologi og genomikk/proteomikk. Et annet konsept er DNA-vaksiner, der genet som koder for antigenet man vil ha en immunrespons mot blir tilført fiskens celler. Dette gir formelt sett en genmodifisert organisme, og metoden er av den grunn omstridt. Det er viktig å merke seg at slike vaksiner har gitt lovende resultater mot alvorlige virussykdommer. Eventuelle innvendinger på etisk eller livssynsmessig grunnlag må vektes mot fordeler i form av forbedret velferd for oppdrettsfisk, både i form av reduserte bivirkninger ved vaksinasjon, og redusert alvorlighet eller hyppighet av sykdom.

Rapporten tar utgangspunkt i oppdrett av laks og ørret, men vaksinasjon vil også være en forutsetning for oppdrett av andre fiskearter, som torsk og kveite. Det er betydelige variasjoner mellom ulike fiskearter, og det må understrekes at kunnskap fra laks ikke uten videre kan overføres direkte til en utviklingshistorisk fjerntliggende art som torsk. Av denne grunn har vi også valgt å fokusere på norske forhold – dvs. norske oppdrettsarter og norsk oppdrettsteknologi.

Vaksinasjon er i dag en forutsetning for en sykdomsforebyggelse som kan gi akseptabel grad av dyrevelferd. Samtidig er vaksinasjon beheftet med bivirkninger som i seg selv kan gi velferdsmessige problemer. Vi har derfor valgt å inkludere et kapittel om vaksinasjon og fiskevelferd, der emner som smerteoppfattelse hos fisk og måleparameter blir drøftet. Ulike vaksinekonsepter og vaksinasjonsmetoder blir drøftet. Hoveddelen av rapporten er en gjennomgang av ulike bivirkninger av vaksinasjon:

- Immunreaksjoner og sammenvoksninger
- Melanindeponering
- Effekter på vekst
- Skjelettdeformasjoner
- Ulike faktorer som kan påvirke utvikling av bivirkninger

Deler av arbeidet med reduksjon av bivirkninger av vaksinerings som er referert i utredningen er utført av Havforskningsinstituttet som en del av industriprosjektet ”Optimal vaksinasjonsstrategi for reduserte bivirkninger (1997–2006), finansiert av Intervet Norbio AS.

Vaksinasjon og fiskevelferd

Dyrevelferd er et komplekst begrep og kan defineres på ulike måter avhengig av verdiutgangspunkt. I en utredning om forskningsbehov på dyrevelferd i Norge (Anon 2005) ble følgende definisjon annektert:

”Dyrevelferd er individets subjektive opplevelse av sin mentale og fysiske tilstand som følge av dets forsøk på å mestre sitt miljø

der velferdsnivået er karakterisert ved balansen mellom positive og negative opplevelser, og helsemessige, atferdsmessige og fysiologiske indikatorer er viktige verktøy for å vurdere dyrets tilstand. *Mental tilstand* inkluderer emosjonelle og kognitive tilstander som påvirkes både av nåværende stimuli og hukommelse om tidligere erfaringer med liknende stimuli, både betingede og ubetingede. *Fysisk tilstand* omfatter fysiske og fysiologiske tilstander som påvirker eller potensielt påvirker mentale prosesser. *Miljøet* omfatter sosialt og fysisk miljø, og øvrige biologiske miljøfaktorer inklusiv mennesket. Med *sosialt miljø* menes artsfrender. Med *fysisk miljø* tenker en både på lokale klimafaktorer og innredninger. Med *øvrige biologisk miljø* tenker en på patogener, parasitter og predatorer, liksom menneske–dyr-forholdet”.

Dette er imidlertid en definisjon som inkluderer kunnskap som vi i liten grad har når det gjelder fisk. Hvordan vi måler fiskens mentale tilstand er i liten grad kjent, mens vi kan si langt mer om fysiske og fysiologiske tilstander. Inntil videre vil dette være det man bør anvende når man skal vurdere dyrevelferdsmessige aspekter av vaksinasjon. Denne rapporten fokuserer derfor primært på fysiske og fysiologiske langtidseffekter av vaksinasjon fordi det er her forskningsinnsatsen har vært. I fremtiden bør en også legge vekt på selve vaksinasjonsprosessen inklusive transport, sammentrenging av fisken, effekt av bedøvelse og rutiner for hvordan fisken behandles i etterkant av vaksinasjonsprosessen (recovery).

Vaksinasjon har som primærmål å hindre utvikling av sykdom og død, og velferden til fisken må selvfølgelig også vurderes i en totalsammenheng der dette vektlegges (se nedenfor om beskyttelse).

Velferdsindikatorer

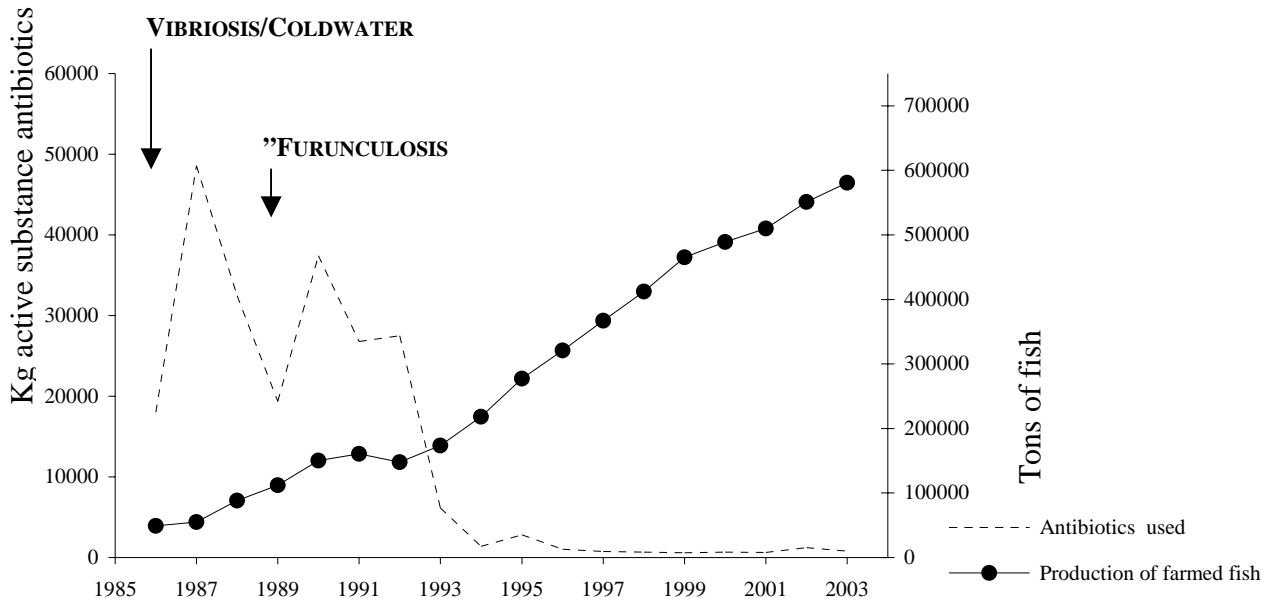
Velferd er et mål på dyrets livskvalitet og kan derfor sjelden måles direkte via en parameter. For eksempel er fravær av sykdom ikke ensbetydende med god velferd. På oppdrettsanleggene brukes i dag parameter som helsetilstand, overlevelse, tilvekst, appetitt og atferd: Når fisken er frisk, har normal atferd, spiser og vokser tilfredsstillende, antar man at den har det bra, og høy produksjon tolkes ofte som et tegn på god velferd. Det mangler i dag forskningsresultater som peker ut gode velferdsindikatorer for akvatiske organismer. Det er derfor et stort behov for identifisering, utvikling og validering av slike indikatorer. God helsestatus er selvsagt viktig, men er ikke alene tilstrekkelig som velferdsindikator. Forskingen rundt utvikling av velferdsindikatorer fokuserer ofte på å utvikle indekser som er sammensatt av en rekke miljøer, atferdsmessige og fysiologiske mål (Bartussek 2001, Bracke et al. 1999, Capville og Vessier 2001). For fisk gjorde Turnbull m.fl. (2005) et forsøk i denne retningen ved å lage en indeks som kombinerte fysiologiske og morfologiske mål. Dawkins (2003) hevder at atferdsobservasjoner er et viktig hjelpemiddel til både å forstå preferanser og til klinisk og preklinisk vurdering av helsestatus. Som denne rapporten viser er det for fisk ikke utviklet slike helhetlige indikatorer, men det er gjort målinger av en rekke miljøer og fysiologiske/fysiske parametere som vurderes enkeltvis. Disse bør være et godt grunnlag for å utvikle forslag til operasjonelle velferdsindikatorer som kan benyttes til dyrevelferdsmessige vurderinger av velferdseffekter av blant annet vaksinasjon.

Smerteoppfattelse hos ulike arter

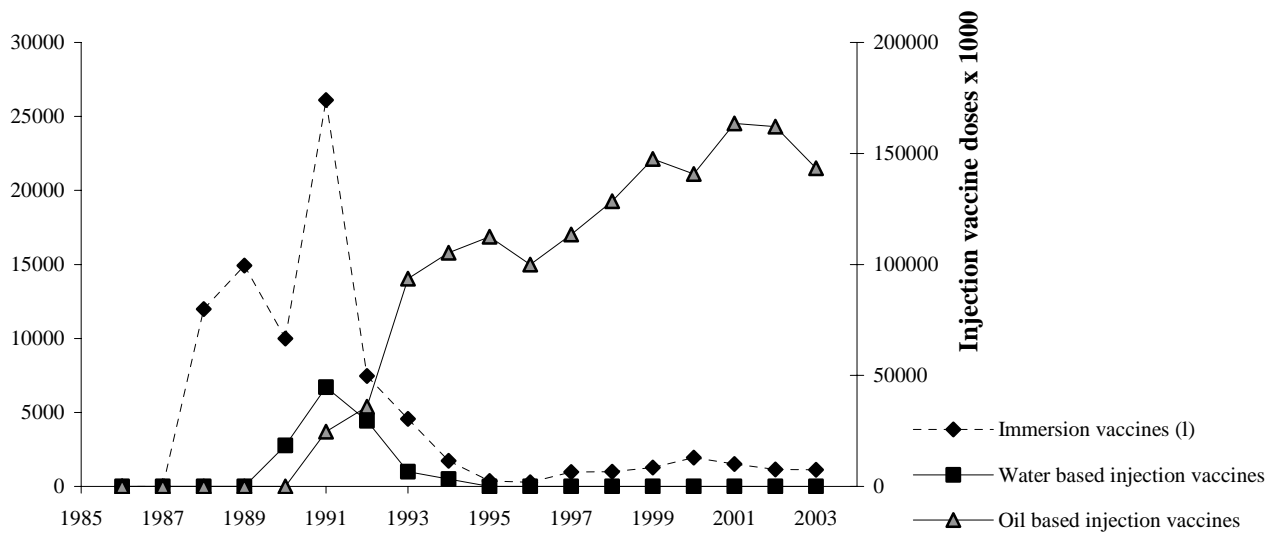
Det er omdiskutert om fisk har en bevisst opplevelse av smerte og om fisk kan lide. Noen hevder at det er vitenskapelig bevist at fisk ikke kan føle smerte fordi bevissthet om smerte er knyttet til fremre hjernebark, og siden fisk ikke har disse strukturene kan de ikke oppleve smertefulle påvirkninger (Rose 2002). Fugler og de fleste pattedyr har heller ikke denne delen av hjernen som Rose henviser til. Det er imidlertid en allmenn oppfatning at også andre pattedyr og fugler har evnen til å oppleve smerte og lidelse. En forklaring til dette skulle kunne være andre hjernestrukturer hos disse dyrene har funksjoner tilsvarende den som fremre hjernebarken har hos menneske (for eksempel Braithwaite og Huntingford, 2004). Nyere forskning viser at fisk er rikt utstyrt med smertereseptorer og nerveforbindelser til hjernen og viser langvarige atferdsmessige tegn på lidelse når de utsettes for antatt smertefulle påvirkninger (Sneddon et al. 2003). Chandroo et al. (2004 a, b) fokuserer på om fisk har en bevissthet vedrørende egne lidelser og refererer til flere forsøk som indikerer at ulike fiskearter har såkalt "deklarativ representasjon" karakteristisk for bevissthet samt nevroanatomiske, farmakologiske og atferdsmessige undersøkelser som kan tyde på at fisk opplever affektive tilstander og konkluderer med at fisk har evnen til å lide. Også en nyere norsk litteraturstudie (Sohlberg et al. 2004) og den engelske utredningen om fiskevelferd (FSBI 2002), konkluderer med at fisk sannsynligvis er i stand til å lide. De refererer til undersøkelser som viser at fisk har neurofysiologiske, neuroanatomiske og biokjemiske forutsetninger for en formidling av potensielt smertefulle stimuli slik vi kjenner det fra pattedyr.

Det er ikke gjort forskning på eventuell smerteopplevelse hos fisk i forbindelse med vaksinasjon. Fremtidig forskning på dette bør fokuseres både på smerte i forbindelse med selve vaksinasjonsprosessen (for eksempel har fisk smertereseptorer i buk og bukhulen) og smerte i forbindelse med inflammatoriske reaksjoner på vaksinen i bukhulen.

A



B



Figur 1. (a) Forbruk av antibiotika i norsk fiskeoppdrett (målt i kg aktiv substans) sammenstilt med produksjonen av oppdrettsfisk (tonn). (b) Forbruk av vaksiner i norsk fiskeoppdrett. Figur fra Sommerset m.fl. (2005). (a) Consume of antibacterial agents in Norwegian aquaculture (measured in kg active substance) and the production of farmed fish (tonnes) (b) Consume of vaccines in Norwegian aquaculture. Figure from Sommerset et al. (2005).

Beskyttelse og redusert sykelighet

Vi vil hevde at vaksinasjon er en forutsetning for den norske og internasjonale lakse- og ørretoppdrettsnæringen (Sommerset m.fl. 2005). I tillegg til den dyrevelferdsmessige effekten av redusert sykelighet er effekten av vaksinasjon målbar i form av redusert forbruk av antibakterielle midler (Lillehaug et al. 2003). Det er lite trolig at et forbruk av antibakterielle midler på nivå med det man hadde i Norge i perioden 1986–92 ville ha blitt tolerert av opinionen over lang tid. Høyt forbruk av antibakterielle midler var assosiert med betydelige resistensproblemer. Effekten av antibakterielle midler ble da redusert over tid. Forbruket er i dag svært lavt, og har i praksis ligget under eller like over ett tonn siden 1993 (Lillehaug m.fl. 2003). Dette utgjør neppe et vesentlig miljøproblem. Til sammenlikning er det totale forbruket til dyr i Norge ca. åtte tonn, og til mennesker 50 tonn. En slik statistikk hadde vært utenkelig uten vaksiner.

Vaksiner mot bakterielle patogener er med visse unntak svært effektive i dag. Dette er årsaken til den kraftige nedgangen i antibakterielle midler som er vist i figur 1. Unntakene gjelder vesentlig intracellulære bakterier som *Piscirickettsia*, *Rickettsia* og *Renibacterium* spp. Siden disse bakteriene opptrer intracellulært vil utfordringene for fiskens immunsystem på mange måter likne det som er tilfellet ved virus. Så langt er vaksiner mot virussykdommer mindre effektive, og ingen vaksiner mot fiskeparasitter finnes tilgjengelig på markedet (Sommerset m.fl. 2005).

Birvirkninger av vaksinasjon i bukhulen

I senere avsnitt blir det redegjort for hvilke typer bivirkninger injeksjonsvaksiner normalt medfører, og hva som i avvikende tilfeller kan utvikles av bivirkninger. Uavhengig av diskusjon om hva fisk kan oppfatte av smerte, må vi forholde oss til at fisk kan registrere ubehag eller avvik fra en normalt tilstand.

I de aller fleste tilfeller vil vaksinasjon gi moderate sammenvoksninger i bukhulen på laks. Under normale vekstforhold vil fisk med slike moderate sammenvoksninger ikke vokse dårligere enn uvaksinert fisk. Dette skulle kunne indikere at fisken ikke har svekket allmenntilstand på grunn av vaksinasjon. Under optimale vekstforhold vokser imidlertid uvaksinert fisk bedre enn vaksinert fisk. Årsaken til dette er foreløpig ukjent.

Ut fra kunnskap på dyr og mennesker vet man at bukhinnebetennelse med sammenvoksninger medfører ubehag. Dette antas også å gjelde hos fisk. Slik sett er det et mål å redusere bivirkningsgraden så mye som mulig. Veid opp mot fordelene med vaksinasjon med redusert sykelighet og dødelighet, anses dagens normale sammenvoksninger som akseptable, selv om bivirkningene må reduseres på lengre sikt.

I avvikende tilfeller med mye sammenvoksninger og medfølgende vekstreduksjon, påvirker bivirkningene fisken i en slik grad at fiskens "allmenntilstand" anses som svekket. Det antas at sammenvoksninger gir ubehag og at det kan gi funksjonsproblemer i bukhulen. Hvor stor andel fisk med avvikende bivirkninger som skal aksepteres må vurderes av regulerende myndigheter.

Det er viktig at arbeidet med å forbedre vaksinasjonsstrategiene styrkes, slik at man oppnår optimal beskyttelse til riktig tid, redusert bivirkningsprofil, og at innslag av fisk med avvikende bivirkninger minimaliseres. I tillegg må det legges vekt på å forbedre dagens vaksiner og utvikle nye vaksiner.

Det bør for eksempel vurderes å sette grenser for kombinasjon av minimum fiskestørrelse ved maksimum temperatur, med mindre det kan dokumenteres for de ulike vaksinene at de er trygge. Likeledes bør det vurderes om det ved vaksinetesting bør stilles mer spesifikke krav til fisk og miljøforhold.

Ryggradsdeformasjoner er et såkalt multifaktorielt problem, d.v.s. at flere ulike faktorer er involvert. Hvilke mekanismer som påvirker deformasjoner er ikke godt nok kjent. Det er vist at deformasjoner kan samvariere med vaksinasjonsregime. Ut fra dagens kunnskap om hva som påvirker ryggradsdeformasjoner, er det beste råd foreløpig å følge et vaksinasjonsregime som gir minst mulig sammenvoksninger. Dette vil trolig redusere risiko for ryggradsdeformasjoner knyttet til vaksinasjon. Normalt er innslaget av deformert fisk lavt, men i de av våre forsøk hvor det er blitt observert en betydelig andel deformert fisk, har vaksine/vaksinasjon kunnet forklare mellom 50 % og 90 % av deformasjonene. Årsakene til ryggradsdeformasjoner er imidlertid komplekse, og også uten vaksinasjon vil ryggradsdeformasjoner være til stede.

VAKSINASJON OG IMMUNSYSTEMET TIL FISK

Vaksinering er den viktigste metoden for å forebygge infeksjonssykdommer hos mennesker og dyr. Prinsippet for vaksinering er at man stimulerer immunsystemet på en slik måte at hvis individet på et senere tidspunkt kommer i kontakt med den patogene organismen, så vil en rask immunrespons bli utløst slik at infeksjonen blir hindret. En forutsetning for vaksinering er derfor immunologisk hukommelse, noe som er til stede hos alle virveldyr, inklusiv fisk.

Immunsystemet har mange ulike effektor-mekanismer (antistoffer, cytotoksiske celler, komplement-systemet, etc.) for uskadliggjøring av patogene organismer. Hvilken av disse mekanismene som er nødvendig – og tilstrekkelig for å stoppe en infeksjon – er avhengig av egenskapene og livssyklusen til den patogene organismen. For eksempel vil en humoral immunrespons med dannelse av antistoffer ikke være tilstrekkelig for å hindre infeksjon av en intracellulær patogen organisme fordi antistoffer i seg selv ikke kan trenge inn i celler. Her må man i tillegg få stimulert en såkalt ”cellulær immunrespons”. Der vil såkalte cytotoksiske T-celler lysere de infiserte cellene, d.v.s få dem til å gå i oppløsning, og dermed blottlegges mikroorganismene.

Det er heller ikke vilkårlig hvilke deler av den patogene organisme det blir dannet en immunrespons mot. Det er ofte noen få komponenter av den patogene organismen (”de beskyttende antigenene”) man må oppnå en relevant immunrespons mot for å få en beskyttende effekt. Eksempler på slike beskyttende antigener kan være overflateproteiner eller toksiner.

For å få en beskyttende effekt av vaksinen er det imidlertid ikke bare viktig at de riktige antigenene er til stede, men også at disse blir presentert for immunsystemet på riktig måte. Antigen prosessering er viktig i denne sammenhengen. Antigener som kommer inn i kroppen i ”partikkelform” blir tatt opp av profesjonelle antigenpresenterende celler ved pinocytose og deretter presentert på overflaten av cellene assosiert med MHC klasse II. Dette gir en immunrespons hovedsakelig i form av T-hjelpeceller type 2 (T_H2), B-celler og antistoffproduksjon. Antigener som blir produsert inne i cellens cytoplasma, for eksempel fra et virus,

vil bli prosessert og presentert på overflaten av cellen sammen med MHC klasse I. Dette medfører hovedsakelig en cellulær immunrespons med dannelse av T-hjelpeceller type 1 (T_H2) og cytotoksiske T-celler. Det eksakte utfallet av en immunisering vil i tillegg være avhengig av at andre celletyper (makrofager, neutrofile celler) er til stede og om disse blir stimulert til å produsere den ene eller andre typen av cytokiner som kan drive immunresponsen i den ene eller andre retningen.

Ved utvikling av effektive vaksiner er altså utfordringen å få presentert ”riktig” antigen på en ”riktig” måte, slik at man får induert en immunologisk hukommelse som medfører at hvis individet blir utsatt for den patogene organismen så vil det raskt oppstå en egnet immunrespons slik at infeksjonen bli stoppet.

I tillegg til å gi høy beskyttelse vil man også stille en del andre krav til en vaksine. For vaksiner til oppdrettsfisk vil dette være:

1. Vaksinen bør raskest mulig gi høy beskyttelse mot sykdommen, og beskyttelsen bør vedvare over lang tid. I praksis bør fisken være beskyttet gjennom hele produksjonssyklus fram til slakting.
2. Vaksinen bør gi beskyttelse mot forskjellige varianter (stammer) av den patogene mikroorganismen.
3. Vaksinen bør ikke inneholde former av den patogene organismen på en slik måte at denne igjen kan bli infeksjons (revertere) og gi sykdomsutbrudd.
4. Vaksinen bør kunne administreres til fisken på enklest mulig måte og gi minimal stress for fisken. Vaksinekonseptet bør være forenlig med andre vaksiner slik at man unngår flere vaksineringsomganger.
5. Vaksinen bør være så billig som mulig.
6. Vaksinen bør ha lang holdbarhet og være stabil, både før og i rimelig tid etter at forpakningen er åpnet.
7. Vaksinen bør være lett å kvalitetskontrollere, og den bør være lett å reproducere slik at produktet blir mest mulig likt fra gang til gang.
8. Vaksinen bør gi minimalt med bivirkninger (f.eks. pigmentering eller sammenvoksninger (adheranser) i bukchulen, eller redusert vekst). Bivirkninger må vurderes både med hensyn til dyrevelferd og med hensyn til markedsværdien av sluttproduktet.
9. Vaksinen og vaksinasjonsmetoden må være etisk akseptabel for forbrukerne og allmennheten.

Vaksinetyper til fisk

Det følgende kapitlet er en sammenstilling av ulike konsepter vaksiner kan produseres og settes sammen (formuleres) på. Dette er et fagfelt i rivende utvikling. Selv om norsk akvakultur fortsatt er svært avhengig av vaksiner basert på drepte mikroorganismer – tilsier utviklingen at rekombinante vaksiner eller DNA-vaksiner i stor grad vil kunne overta i fremtiden dersom det er vilje hos næringen og myndighetene til dette.

Vaksiner basert på drepte mikroorganismer:

Slike vaksiner fremstilles ved å dyrke opp den patogene mikroorganismen i stor mengde og deretter inaktivere (drepe) mikroorganismen, vanligvis ved hjelp av formalin. Dette er tilstrekkelig for å lage vaksiner som virker både ved bad, dypp og injeksjon mot sykdommer som vibriose og kaldtvannsvibriose, forårsaket av henholdsvis *Vibrio anguillarum* og *Vibrio salmonicida*.

For bakterien *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*, som forårsaker furunkulose, vil en slik fremgangsmåte ikke være helt tilstrekkelig. Suspensjonen av drepte bakterier må i tillegg blandes (emulgeres) i olje og injiseres i fiskens bukhule for å gi en tilfredsstillende beskyttelse. Oljen gir en ekstra stimulering av immunsystemet (adjuvant) samtidig som den medfører at bakteriekomponenten blir langsomt frigitt i bukhulen.

For noen bakteriesykdommer som BKD (bacterial kidney disease) vil en vaksine basert på drepte bakterier ikke gi noen beskyttelse, selv om den tilsettes olje som adjuvants. Denne sykdommen forårsakes av en intracellulær bakterie, *Renibacterium salmoninarum*.

Når det gjelder virussykdommer vil nok injisering av drepte virus i mange tilfeller medføre at man kan få beskyttelse mot sykdom. Problemet her vil være oppdyrking av virus. Dette må gjøres i cellekulturer, og er svært kostnadskrevenende.

Attenuerte vaksiner:

Såkalte "attenuerte" vaksiner består av levende mikroorganismer som er blitt behandlet ("attenuert") slik at de ikke lenger kan fremkalle sykdom, og de blir brukt som vaksiner i en levende form. Attenueringen må skje på en slik måte at infeksjon med den attenuerte formen også fører til en beskyttende immunrespons mot den tilsvarende patogene formen av mikroorganismen. Attenuerte vaksiner har vært i bruk innenfor humanmedisin i lang tid, både mot bakteriesykdommer (tuberkulose, BCG) og virussykdommer (poliomyelitt).

Tidligere ble attenueringen utført ved at den patogene organismen ble dyrket i laboratoriet over lang tid, ofte på spesielle dyrkningsmedier, inntil de mistet sin virulens. Man visste da ikke hvilke forandringer som egentlig hadde skjedd. I dag kan vi, ved hjelp av genteknologi, utføre målrettede forandringer av mikroorganismenes arvestoff. Forandringene kan gjøres på en slik måte at faren for at mikroorganismen går tilbake til den virulente formen blir uhyre liten.

Ettersom de blir gitt i en levende form ville attenuerte vaksiner sannsynligvis hatt god effekt selv om den ble gitt til fisken oralt. Slike vaksiner ville også kunne bli gitt på et mye tidligere tidspunkt enn andre typer vaksiner.

En innvending mot attenuerte vaksiner er at disse ville vanskeliggjøre sykdomsovervåking ved at det ville bli vanskelig å skille mellom mikroorganismen gitt som vaksine og den tilsvarende patogene formen. Det er imidlertid mulig å utføre attenueringen på en slik måte at disse to formene kunne skilles fra hverandre.

Ettersom attenuerte vaksiner laget ved hjelp av molekylærbiologi vil være å betrakte som genmodifisert organisme (GMO), vil de måtte godkjennes også ifølge genteknologiloven.

Rekombinante vaksiner:

Som nevnt er det ofte bare et fåtall komponenter av en patogen mikroorganisme som er ansvarlig for den beskyttende immunresponsen. I de fleste tilfeller er det snakk om proteinmolekyler. Prinsippet for rekombinante vaksiner er å isolere genene som koder for slike proteiner og deretter klonere disse inn i vektorer som kan overføres til bakterier (f.eks. *E.coli*) for produksjon av rekombinante proteiner i stor mengde. Produksjonen kan også foregå i gjær- eller cellekulturer. De rekombinante proteinene tilsettes eventuelt olje og andre adjuvants og brukes som vaksiner.

Rekombinante vaksiner er spesielt aktuelle når det gjelder vaksiner mot mikroorganismer som det er vanskelig eller kostnadskrevende å dyrke i større mengder, eksempelvis virus i cellekulturer. Den eneste rekombinante vaksinen som er kommersiell tilgjengelig for bruk på fisk i dag er en vaksine mot IPN som er utviklet i Norge.

DNA-vaksiner:

Prinsippet for DNA vaksiner er å la rekombinante proteiner bli produsert inni cellene til dyret som skal vaksineres. Dette gjøres ved at gener fra den patogene organismen blir klonet bak en sterk promotor i en plasmidvektor som så injiseres i muskelceller. Spesielt for intracellulære patogener (virus og såkalte bakterier som lever inne i vertens celler) har man hatt store forventninger til denne typen vaksiner. Fordelen med metoden er at proteinmolekylet blir uttrykt inne i cellene og vil dermed stimulere immunsystemet på tilsvarende måte som ved en naturlig virusinfeksjon.

De første DNA-vaksinene som ble laget var mot rhabdovirusene VHSV og IHNV og testet ut på laksefisk. Disse vaksinene viste en overraskende god beskyttelse. Sannsynlig var det her snakk om både uspesifikk og spesifikk immunrespons ettersom beskyttelsen startet bare noen få dager etter vaksinerings og varte i flere måneder.

Adjuvans og uspesifikke immunstimulatorer:

Som nevnt ovenfor blir vaksiner tilsatt ulike typer hjelpestoffer for at de skal ha bedre virkning. Egentlig er det to typer slike hjelpestoffer; adjuvans og stoffer som kommer under betegnelsen "leveringssystemet" ("the delivery system").

Adjuvans tilsettes vaksiner for at immunsystemet skal bli trigget til å la seg stimulere av komponentene fra mikroorganismen som skal føre til spesifikk immunreaksjon. Eksempler på hjelpestoffer er aluminiumhydroksid og visse typer glukaner fra gjærceller. Det er også mulig å benytte immunsystemets egne komponenter som adjuvans. Cytokiner, enten fremstilt rekombinant eller ved å kloner cytokingener inn i DNA-vaksiner, kan benyttes til å påvirke immunresponsen i bestemte, ønskede, retninger. Det kan også være ønskelig at en vaksine skal stimulere det uspesifikke immunsystemet som f.eks. at kroppen produserer interferoner som vil motvirke mange typer virusinfeksjoner. Dette vil føre til en tidlig (cirka 3–7 dager etter vaksinerings), men kortvarig (opp til ti uker) uspesifikk beskyttelse. På den måten kan man unngå sykdomsutbrudd innen den spesifikk immunresponsen får bygd seg opp, noe som vanligvis tar 6–10 uker fra vaksinerings tidspunktet. En slik uspesifikk immunstimulator er oligodeoksynukleotider som motiverer på samme måte som bakterielt og viralt DNA, og blir oppfattet som et faresignal av immunsystemet. Slike sekvenser er det lett å inkludere i vektorer brukt til DNA-vaksiner.

"Leveringssystemet" er måten en injisert vaksine blir frigitt i kroppen. Emulgering kommer inn her. Hvis antigener løst i vann emulgeres i olje, vil det dannes små vanndråper i en oljefase. Hvis dette injiseres inn i for eksempel bukhulen til en fisk, vil antigenet bli frigitt langsomt. Noen av oljene som brukes har også en immunstimulerende effekt i seg selv. Dette har vist seg å gi en økt immunologisk stimulering.

Effekt av vaksinasjonsmetoder på fisk

Metoder for administrering av vaksiner:

Den mest brukte metoden for å gi vaksine til oppdrettsfisk i dag er *injeksjon* i bukhulen, selv om dette er den metoden som er mest arbeidskrevende og som i tillegg stresser fisken mest. Grunnen er at denne fremgangsmåten er nødvendig for at en del vaksiner (f.eks. furunkulose) skal gi tilfredsstillende beskyttelse. Ettersom det er blitt vanlig å blande sammen flere vaksiner til kombivaksiner (f.eks. vibriose, kaldtvannsvibriose og furunkulose) så blir alle gitt ved en og samme injeksjon. Mot vibriose ville man imidlertid fått en tilfredsstillende beskyttelse ved å *bade* eller *dyppe* fisken i vaksine, noe som stresser fisken mindre og er mindre arbeidskrevende. Den mest ønskelige måten å gi vaksinen på ville være å gi den *oralt* (blande den i føret), men denne metoden har til nå dessverre vist seg å være lite effektiv. Sannsynligvis vil det bare være levende vaksiner (se under) som vil gi beskyttelse om de ble gitt oralt.

Bad og dypp

Såkalt immersjonsvaksinering, det vil si bad- eller dyppvaksinering avhengig av tid, er effektiv for en rekke bakterielle patogener. Metoden er lite arbeidsintensiv og enkel å anvende, særlig på liten fisk. Den gir gode resultater for enkelte bakterielle patogener, særlig vibriose på marin yngel. Varigheten av beskyttelsen regnes generelt som dårligere enn ved injeksjon, men offentlig tilgjengelig dokumentasjon er mangelfull. Dosering per fisk er dårligere kontrollert enn injeksjonsvaksiner, og forbruket av vaksine kan være høyere.

Den vesentlige ulempen ved immersjonsmetoder er knyttet til at metoden kan gi dårligere effekt for enkelte av komponentene i multikomponentvaksiner enn tilfellet er ved injeksjonsmetodikk. Vaksinasjon mot furunkulosebakterien *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* gir vesentlig bedre varighet og beskyttelse ved injeksjon med adjuvans enn ved dypp eller bad.

Bad og dypp er særlig aktuelt for kveite og torsk. Rødseth og Tangerås (2002) anbefaler dypp av torskeyngel i størrelsesorden 0,5–1 g, gjentatt dypp i størrelsesorden 2–5 g etterfulgt av stikkvaksinasjon ved 20 g eller større. Anbefalt dosering er 30–60 sekunder i vaksine fortynnet til 1:10 (dypp) eller 60–90 minutter i vaksine fortynnet til 1:500 (bad). Det er utført en del vaksinasjonsforsøk med kveite og torsk. Selv om resultatene er varierende, særlig for torsk, er det klart at storskala oppdrett av disse fiskeartene vil være utenkelig uten vaksinasjon (se review-artikler av Bergh m.fl. 2001a og Samuelsen m.fl. 2006). En viss reduksjon i vekst kan registreres, men det er ikke knyttet vesentlige velferdsmessige problemer til bad- og dyppvaksinasjon.

Injeksjon

Vaksinasjon ved injeksjon er i dag den dominerende administrasjonsmetode til laksefisk i Norge. Metoden er vesentlig mer arbeidsintensiv enn bad og dypp. Det kreves at fisken er over en viss størrelse, noe som gjør anvendelse på små stadier av for eksempel torsk og kveite lite aktuell. Når metoden er så dominerende i norsk laksefiskproduksjon, skyldes det behovet for adjuvans. De fleste vaksiner til laks er multikomponentvaksiner, og minst én av komponentene krever injeksjon og bruk av oljeadjuvans for å være effektiv. Volumet av vaksineformuleringen per fisk er relativt begrenset. Hver fisk sikres en korrekt dosering. I industriell lakseproduksjon benyttes både automatiserte vaksinasjonsmaskiner og håndvaksinering.

Sammenvoksnings og andre vesentlige vaksinasjonsskader er knyttet til injeksjon av vaksiner med adjuvans.

Oral vaksinasjon

Sommerset et al. (2005) skriver følgende om oral vaksinasjon: Oral vaksinasjon, med antigener inkludert i fôret, ville være den ideelle metode for administrasjon av vaksiner til fisk, og betydelig innsats har vært satt inn på utvikling av slike vaksiner. Imidlertid er resultatene fra forsøk med konvensjonelle orale vaksiner begrensede og inkonsistente, på grunn av antigennedbrytning i mage/tarm (Hart m.fl. 1989, Quentel et al. 1997). Forskjellige metoder for beskyttelse av antigenet mot nedbrytning, slik som inkludering i liposomer eller alginatkuler, nøytralisering av sekreter i mage/tarm eller bruk av biofilm-vaksiner (Azad et al. 2000) har gitt enkelte positive resultater. Store mengder av antigener er vanligvis nødvendig, og beskyttelsen er generelt begrenset og av kort varighet. Oral vaksinasjon kan være av spesiell interesse for tidlige livsstadier av marin fisk, siden administrasjonsmetoden ikke innebærer noen form for håndteringsstress. Vaksiner kan inkorporeres i levendefôrorganismer (Bergh m. fl. 2001b).

Nye vaksiner

Vaksiner har vært det klart viktigste elementet i forebyggende sykdomsarbeid i norsk akvakultur. Utviklingen av effektive vaksiner mot kaldtvannsvibriose og furunkulose var hovedårsaken til den kraftige nedgangen i antibiotikaforbruket tidlig på nittitallet. Industrialisert fiskeoppdrett som vi kjenner det i dag er en umulighet uten systematisk bruk av gode vaksiner.

I sin enkleste form er vaksiner basert på drepte eller svekkede mikroorganismer. Vaksinerne mot de vanlige bakterielle sykdommene er basert på at mikroorganismene dyrkes opp i store mengder og drepes med formalin. For kaldtvannsvibriosen var dette tilstrekkelig. For furunkulosevaksinen måtte man i tillegg inkorporere en såkalt "adjuvans", som er et hjelpestoff som øker vaksinenes effekt. Tradisjonelle vaksiner mot virus inneholder drepte eller svekkede virus, men det er ofte vanskelig å få tilstrekkelige mengder av viruset til at man klarer å få til en immunologisk respons. De senere årene har rekombinant DNA-teknologi blitt tatt i bruk i vaksineutvikling. Et eksempel på bruk av slik teknologi er vaksinen mot IPNV som ble tatt i bruk i Norge for noen år siden. Her bruker man en genetisk modifisert bakterie til å lage store mengder av et overflateprotein fra viruset. Det er dette overflateprotein som er vaksinen. Den genmodifiserte bakterien slipper aldri ut av laboratoriet, og selve fisken utsettes bare for et protein. Mange vanlig brukte legemidler til mennesker og dyr produseres på denne måten, og slik bruk av bioteknologi er i dag ikke regnet som kontroversiell. Forskningsfronten tar nå utgangspunkt i bioinformatikk som kan brukes til å kartlegge overflatestrukturer på mikroorganismene som kan være interessante for vaksineutvikling.

En annen forskningsfront er såkalte DNA-vaksiner. Her settes genet fra mikroorganismen inn i dyret som blir vaksinert, slik at dyret selv produserer det stoffet som skal gi et immunsvær. Erfaringer fra laboratorieforsøk er svært lovende. Metoden er sikker, billig og gir god beskyttelse. Negative konsekvenser av slike vaksiner er ikke kjent. Om de likevel blir tatt i bruk i oppdrett kan ha mer med politikk og markedsaksept enn med biologi å gjøre.

Behandling: Hver art er spesiell

Selv om søkelyset i fiskehelsearbeid må settes på sykdomsforebygging, er det helt nødvendig å sikre at den fisken som likevel blir syk får adekvat behandling. Det å holde dyr i fangenskap

forplikter, og syke dyr har krav på behandling. Vi kan si at forebygging er Plan A, og behandling er Plan B. Å satse alt på at Plan A alltid holder vil være uetisk og urealistisk. Erfaring har vist at kunnskapen om behandling av marine fiskearter er utilstrekkelig. I praksis har veterinærene vært henvist til å behandle kveite og torsk etter samme prosedyrer som fantes for laks. Fysiologien til disse artene er svært ulik, og de står også langt fra hverandre i evolusjonshistorien. Behandling av kveite og torsk er omtalt i review-artiklene til Bergh m. fl. (2001a) og Samuelsen m.fl. (2006)

Fiskelarver kan ikke vaksineres

Anadrome laksefisk er ulik marine fisk. Laks og regnbueørret klekker på relativt avanserte stadier. De lever i et ferskvannsmiljø de første kritiske livsstadiene. Dette miljøet kan holdes relativt fritt for patogener med dagens teknologi. For en stor del er for eksempel marine bakterier ikke i stand til å vokse i ferskvann. Det finnes enkelte sykdomsproblemer som kan være aktuelle, særlig virus som kan finnes i ferskvann.

Fiskelarver kan generelt ikke vaksineres på sine tidlige livsstadier. De fleste fiskearter klekker på et relativt primitivt utviklingsstadium, og de delene av immunforsvaret som kan kjenne igjen "fiender" blir først utviklet noe seinere. Fra studier av kveite, torsk og piggvar vet vi at dette først skjer etter startfôring. I praksis betyr dette at man er avhengig av andre metoder for sykdomsforebygging. Både alminnelige hygienetiltak, probiotika og uspesifikk immunstimulering kan være viktige komponenter.

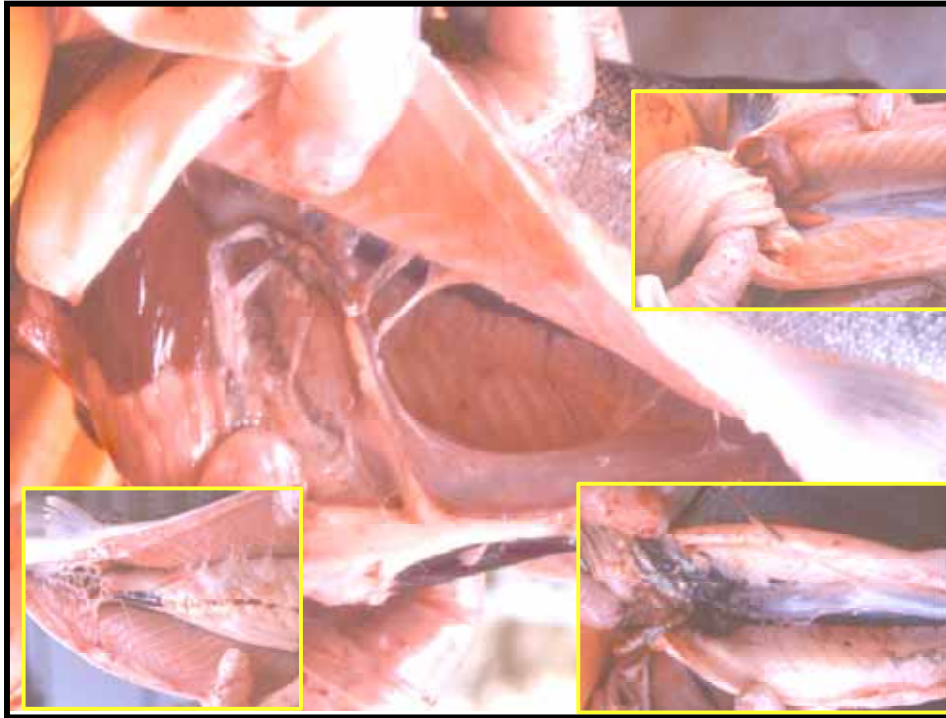
BIVIRKNINGER AV VAKSINASJON

Immunreaksjoner og sammenvoksninger

Furunkulose ble introdusert til Norge fra Skottland i 1985 (Egidius 1987), og førte til store tap i lakseoppdrett på slutten av 80-tallet (Midtlyng 1996). Bruk av vannbaserte vaksiner hadde ikke god nok langtidseffekt mot furunkulosebakterien. Tidlig på 90-tallet gjenoppdaget man, og tok i bruk oljebasert adjuvans, i vaksinen mot furunkulose (Kranz m.fl. 1964; Midtlyng 1996, 1998). Man fikk da effektiv langtidsbeskyttelse mot sykdommen og svært stor reduksjon i risiko for dødelighet (Midtlyng 1998). Etter 1993 har furunkulose i all hovedsak vært fraværende i næringen (Lillehaug m.fl. 2003).

Med introduksjon av oljebaserte vaksiner i lakseoppdrett fikk man også bivirkninger (Poppe & Breck 1997; Midtlyng 1998). All vaksinert fisk fikk inflammasjoner ved injeksjonsstedet (Midtlyng 1996b; Lund m.fl. 1997), og de fleste fikk sammenvoksninger mellom organer, og mellom organer og bukvegg (Midtlyng 1996; Midtlyng m.fl. 1996a). Redusert appetitt og vekst i første fase etter vaksinerings er rapportert (Midtlyng m.fl. 1996b; Sørum & Damsgård 2004; Berg m.fl. 2006). I alvorlige tilfeller kan sammenvoksninger gi redusert funksjon i reproduksjonsorganer slik at fisken ikke er brukbar til stamfisk.

Normalt vil sammenvoksninger i bukhulen fjernes ved slakting. I alvorlige tilfeller kan sammenvoksningene også sitte i bukveggen. Ved sløyting får en da filetskader som fører til nedklassing (Poppe & Breck 1997; Midtlyng 1996; Midtlyng 1997). Sammenvoksninger klassifiseres visuelt på en skala fra 0 til 6, hvor 0 tilsvarer uvaksinert fisk og 6 er svært alvorlige sammenvoksninger og melanindeponering i bukhulen (Midtlyng & Lillehaug 1996b).



Figur 2: Sammenvoksninger og melanindeponering i bukhulen etter vaksinasjon av laks. *Adherations and deposits of melanin following vaccination of salmon*

Det er en klar sammenheng mellom immunreaksjon og sammenvoksninger. Det er immunreaksjonen som oppstår når oljeadjuvans og antigen sammen forårsaker vevsirritasjon og inflammasjon som gir beskyttelse. Injeksjon av adjuvans eller antigen alene gir ikke sammenvoksninger (Mutoloki m.fl. 2006), men heller ikke beskyttelse. For å gi langtidsbeskyttelse, spesielt mot furunkulose, må der være et vaksinedepot som over lengre tid stimulerer immunsystemet. Det blir derved også en kontinuerlig inflammasjon som kan gi grunnlag for bivirkninger med bl.a. sammenvoksninger. Det er vist at ECP (ekstracellulære produkter) som følge av furunkuloseantigen virker inflammasjonsøkende (Mutoloki m.fl. 2006), og er en viktig årsak til problemene med sammenvoksninger med oljebasert vaksine som inkluderer furunkulose.

Utfordringen er derfor å lage en vaksine som gir tilstrekkelig beskyttelse mot aktuelle sykdommer når beskyttelse er nødvendig. Risiko for sykdom varierer med livsstadium, type patogener og årstid. Samtidig må kombinasjon av antigen og adjuvans gi så små bivirkninger som mulig.

I hovedsak er grad av sammenvoksninger moderat i oppdrettsnæringen. En og samme vaksine kan imidlertid gi ulik grad av sammenvoksninger, både mellom anlegg, merder og enkeltfisk i merder (Poppe & Breck 1997). Erfaringsmessig har det også vist seg at det er større problem med sammenvoksninger i produksjon av høstsmolt enn i vårsmolt (Vågsholm & Djupvik 1999). I en populasjon kan det imidlertid være enkeltfisk med mye og avvikende sammenvoksninger, eller at det unntaksvis er mye i enkelte grupper av fisk. Det er i hovedsak disse tilfellene som er det største problemet, både fra en økonomisk, etisk og velferdsmessig vurdering.

Også hos andre arter er sammenvoksninger et problem. Ørret får mindre sammenvoksninger i bukhulen enn laks etter injeksjon med oljebaserte vaksiner. På ørret brukes mye vannbasert vaksine, og de oljebaserte vaksinene som brukes har ofte færre komponenter (2 eller 3). De

første forsøkene med oljebasert vaksine mot furunkulose på flekksteinbit var positive mht. beskyttelse, men ga samtidig mye sammenvoksninger i bukhulen. På torsk brukes foreløpig mest vannbaserte vaksiner til injeksjon. Disse gir små sammenvoksninger, og har ikke vært ansett som et problem. Torsk har imidlertid en stor lever, og det kan være vanskelig å unngå å injisere vaksinen i denne. Injeksjon i leveren kan føre til leverforgiftning. Ved bruk av oljebasert vaksine ser man tendenser til samme problem som hos laks mht. sammenvoksninger. Ut fra erfaringene med utvikling av vaksine til laks forventes det at oljebaserte vaksiner etter hvert vil bli tatt i bruk, og at problemene med sammenvoksninger vil gjøre seg gjeldende også hos torsk.

Melanindeponering

Melanin i bukhulen

En normal immunreaksjon etter vaksinerings vil også innebære tilstrømming av bl.a. melanomakrofager og andre makrofaglignende celler. Disse vil som følge av en normal immunreaksjon kunne avsette svart pigment i og på indre organer, eller på bukhinnen. De fleste vaksinerte fisk får melanin på organene, og det kan dannes svarte flekker eller områder på organer og bukhinnen. Normalt vil melanin på bukhinnen fjernes på slaktelinjen, men i alvorlige tilfeller kan det sitte igjen i bukveggen. Dette kan være en viktig grunn til nedklassifisering på slaktelinjen. Unormal pigmentering kan også skyldes andre forhold enn melanin og makrofagaktivitet.

Normalt er det en klar sammenheng mellom grad av sammenvoksninger i bukhulen, og melanindeponering. Unntaksvis kan det være mye sammenvoksninger og lite melanin, eller omvendt.

Også på uvaksinert fisk kan det på enkelte grupper finnes slør av melanin i bukhulen, eller små melaninflekker spred jevnt utover bukhulen. Også før bruken av oljebaserte vaksiner ble vanlig ble det observert større melanindeponeringer hos oppdrettlaks. I melding fra Fiskeridirektøren 21. august 1984 om klassifisering av fisk heter det bl.a. om: "Klasse Superior... *Følgende feil kan aksepteres: ...*

- *Slør eller svake skygger av mørkt fargestoff (melanin) under bukhinnen",*

og i klasse *ordinær* kan følgende feil aksepteres:

"- *Skjev ryggstøyle eller andre mindre misdannelser...*

- *Tydelige avleiringer av mørkt fargestoff (melanin) under bukhinnen eller i muskulaturen".*

På ørret brukes normalt vannbaserte vaksiner, og innslaget av sammenvoksninger og melanin er normalt svært lite. Når oljebaserte vaksiner brukes på ørret, øker innslaget av melanin, men det er i likhet med sammenvoksninger normalt mindre enn hos laks, og anses ikke som et stort problem. De oljebaserte vaksinene som har vært brukt på ørret er ofte 2 eller 3 komponent vaksiner.

Torsk har naturlig svart bukhinne. Når torsk vaksineres med vannbaserte vaksiner blir det lite problem med melanin. Enkelte mindre ansamlinger kan observeres på organpakken. Det er brukt lite oljebaserte vaksiner på torsk, og det er spredte erfaringer med hensyn til melanin. Erfaringer fra vaksineutvikling på laks, tilsier imidlertid at bruk av oljebaserte vaksiner for torsk vil komme, og at problemene med komplekse vaksiner også vil være til stede hos torsk. Her bør det skaffes mer kunnskap før oljebaserte vaksiner tas i bruk i torskeoppdrett.

Skjult melanin i filet

I oppdrettsnæringen er svart pigmentering i fileten på slaktet fisk ett av de problemene som nå har størst fokus. Unormale pigmentflekker i filet har alltid vært et nedklassingskriterium, men problemet har trolig økt og fått mer oppmerksomhet de siste årene. Dette er svarte flekker av ulik størrelse som ligger i selve muskelen. Noen ganger kan den være synlig fra bukhulen, mens andre ganger oppdages ikke flekkene før fisken er filetert. Flekkene ligger ofte med samme lokalisering innen en gruppe fisk, men kan variere mellom grupper. Det kan være en stor, eller flere flekker av ulik størrelse (Vedlegg 1).

Årsaken til disse flekkene er uklar. Det er nærliggende å koble også denne type melanin til vaksinasjon og en immunreaksjon. Koppang et al. (2005) undersøkte melaninflekker på slaktelinje og fant muskelnedbryting med nekrotisk vev, typisk inflammatorisk vev med granulom inneholdende melano-makrofager, samt vakuoler med lipider. Resultatene viste at melaniserte områder i laksefilet var dannet av en inflammatorisk reaksjon, trolig induisert av vaksinasjon. Det innebærer og at vaksinen kan vandre og skape reaksjoner også i fileten.

Studier med vaksinert og uvaksinert fisk i forsøk på Havforskningsinstituttet viser imidlertid at det ble funnet like mye skult melanin på uvaksinert fisk som i vaksinert fisk (Vedlegg 1). I vaksinert fisk var det heller ingen sammenheng mellom vaksintype, eller grad av sammenvoksninger i bukhulen som følge av ulik injeksjonsdose. Innslaget av skjult melanin ble undersøkt i fire ulike forsøk.

I et av forsøkene med ulike vaksiner ble det funnet skjult melanin på fisk i merd i sjø, mens tilsvarende grupper som hadde gått på sjøvann i kar på land, ikke hadde skjult melanin. På land hadde ikke uvaksinert fisk melanin i bukhulen, mens dette var tilfellet på fisken som gikk i merd (Vedlegg 1). Dette tyder på at det er forholdene i sjø som har påvirket både skjult melanin og melanin i bukhulen.

Usikkerhet i omfang og årsak til problemene med pigment i filet gjør at dette bør undersøkes nærmere. Det bør avklares om observerte lipiddråper stammer fra injisert adjuvans, eller er har annet opphav.

Det antas at pigmenteringen i seg selv ikke er et velferdsproblem for fisken, fordi det vanligvis er melanin dannet i forbindelse med en normal immunreaksjon. Men hvis melaninet oppstår pga. en skade, infeksjon eller irritasjon med påfølgende inflammasjon, nekrotisk vev og muskeldegenerasjon antas det at disse skadene kan skape ubehag for fisken uten at det er melaninet og/eller vaksinasjon som nødvendigvis er årsaken.

Påvirkning av vekst

Korttidseffekt

Vekstreduksjon kort tid etter vaksinerer er vist i en rekke forsøk. Denne vekstreduksjonen er imidlertid kortvarig (2–6 uker) (Berg m.fl. 2006). I noen tilfeller viser vaksinert fisk kompensasjonsvekst og er like stor som uvaksinert fisk ved sjøvannsutsett.

Laks har redusert appetitt en kort periode etter vaksinerer (Sørum og Damsgård 2004), men korttidseffekten på vekst kan ha flere årsaker, bl.a. stress, smerte, dårligere energioptak, at energien brukes til immunreaksjon istedenfor vekst, med mer. Laks injisert med saltvann fikk ikke vekstreduksjon (Hoel og Lillehaug 1997), og fisk som bare ble bedøvd og håndtert fikk

ikke redusert appetitt tilsvarende fisk injisert med oljebasert vaksine (Sørum og Damsgård 2004). Dette tyder på at det er reaksjonen på vaksinen som skaper redusert appetitt, og ikke håndtering, bedøvelse, vaksinasjonsstikket, eller injeksjonen i bukhulen i seg selv. Denne reaksjonen kommer like etter vaksinerings. Sammenvoksninger er ennå ikke etablert, slik at det er ikke sammenvoksningene i seg selv som gir ubehag og redusert appetitt.

Korttidseffekt på vekst av vaksinasjon er også funnet på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Rønsholdt & McLean 1999), røye (*Salvelinus alpinus*) (Pylkkö et al. 2000), sik (*Coregonus lavaretus* L.) (Koskela et al. 2004), flekksteinbit (*Anarhichas minor* L.) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) (Ingilæ et al. 2000). Hos torsk (*Gadus morhua* L.) er det ikke rapportert tilsvarende vekstreduksjon (Mikkelsen et al. 2004).

Langtidseffekt

I flere forsøk er det funnet redusert vekst i sjøvann hos vaksinert fisk sammenlignet med uvaksinert fisk (Midtlyng 1998; Midtlyng og Lillehaug 1998). I tillegg har både vaksintype og vaksinasjonstidspunkt vist langtidseffekter på vekst (Oppedal m.fl. 2005; Berg m.fl. 2006). Det er imidlertid også mange eksempler på at det ikke er forskjell i vekst mellom vaksinert og uvaksinert fisk (Hoel og Lillehaug 1997; Mutoloki m.fl. 2004; Berg m.fl. 2005). Midtlyng og Lillehaug (1998) fant stor vekstforskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk på en lokalitet, mens det ikke var forskjell i vekst på to andre lokaliteter med tilsvarende fisk og vaksiner.

Erfaringer fra Havforskningsinstituttet viser at det ofte er i forsøk med god vekst at vaksinert fisk ikke klarer å vokse like godt som uvaksinerte. Som oftest er det i sommerperioden med høy vekstrate at vaksinert fisk ikke klarer å utnytte hele vekstpotensialet. Under normale forhold, eller i perioder med lav vekst, blir det ikke forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk. I partier med mye dårlig fisk er det ofte ikke forskjell på vaksinert og uvaksinert fisk. Da er det oftest andre forhold som har gitt et dårlig resultat.

Unntak fra dette finnes bl.a. i et forsøk hvor høstmolt ble nærmere 4 kg etter 13 md i sjø og det ikke blir forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk (Vedlegg 2). Det er også eksempler på at vaksinert fisk har vokst bedre enn uvaksinert fisk (Buchmann m.fl. 1997).

Den observerte vekstreduksjonen kan ha flere årsaker, uten at de er klarlagt. I alvorlige tilfeller av sammenvoksninger vil det være fysiske skader som gjør det praktisk vanskelig å spise eller fordøye og transportere fôr gjennom mage-/tarmsystemet. Organskader kan gi nedsatt funksjon. Immunreaksjoner, helingsprosesser, ubehag e.l. kan endre metabolismen og allokering av tilgjengelig energi. Dette kan gi endret atferd eller appetitt med redusert fôroptak.

Under normale forhold med moderate sammenvoksninger er ikke skadene av en slik art at det forventes store fysiske skader på fordøyelsessystemet. Eventuell vekstreduksjon forventes derfor å være knyttet til immun-, hormonell- eller metabolske justeringer som gjør at fisken ikke klarer å hente ut maksimal vekst under optimal forhold. Det er ikke rapportert mer om mekanismene som ligger bak de observerte veksteffektene.

I flere tilfeller er det funnet sammenheng mellom grad av sammenvoksning og størrelse på fisk ved slakt, spesielt for sammenvoksninger av grad 3 eller mer (eks. Midtlyng & Lillehaug 1997). Dette viser at alvorlige sammenvoksninger kan gi vekstreduksjon. I andre forsøk er ikke denne sammenhengen funnet (Berg m.fl. 2005). Ofte forsvinner denne sammenhengen når man ser på gruppenivå, istedenfor individnivå. En av årsakene til dette kan være at ved

vaksinering er det en størrelsesspredning i fisken. Det er vist at liten fisk har større sannsynlighet for å utvikle alvorlige sammenvoksninger enn stor fisk (se nedenfor). Dette vil resultere i at de minste fiskene ved slakt fortsatt er de minste og har mest sammenvoksninger. Det kan også være samvirkende faktorer som gjør at de fiskene som vokser saktest også utvikler mest sammenvoksninger. Innenfor normal grad av sammenvoksninger behøver det derfor ikke være at sammenvoksningene i seg selv er årsaken til vekstreduksjonen, selv om det på slaktelinjen ser ut til å være en slik sammenheng.

Erfaringen fra andre arter enn laks er begrenset. Det antas ut fra informasjon fra praktisk oppdrett at alvorlige sammenvoksninger også gir vekstreduksjon på marine arter. På ørret er generelt problemene med sammenvoksninger mindre enn hos laks, og vekstreduksjon anses ikke som et problem.

Skjelettdeformasjoner

Skjelettutvikling og vekst

For å forhindre negativ oppdrift har laksens ryggvirvler en lav beinmasse. Dette har satt store krav til virvelens tredimensjonale struktur, som gjør den sterk nok til å motstå kompresjonskrefter fra svømmemusklaturen. Laksens virvler er bygget opp av en indre timeglassformet kjerne av kompakt bein, som er omgitt av trabekulært bein. Virvlenes midtre del dannes 680 døgngrader (dg) etter befruktning, mens dannelsen av det kompakte og trabekulære beinet starter henholdsvis 800 og 1000 dg etter befruktning (Nordvik m.fl. 2005). Etter hvert som virvelen vokser avsettes det proteiner, hovedsakelig ved det kompakte beinets fremre og bakre del og på utsiden av det trabekulære beinet. Deretter mineraliseres proteinmatriksen, hovedsakelig med fosfor og kalsium (Meunier, 2002). Tidsforskyvningen mellom proteinsekresjon og mineralisering vil kunne øke ved hurtig vekst, spesielt dersom tilgangen av mineraler er lav.

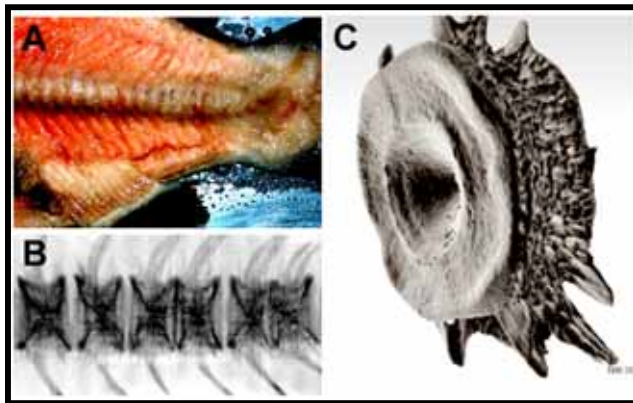
Laksens virvelsøyle er bygget opp av 58 virvler, der de første 30 ligger over bukhulen og har ribbein. Under smoltifisering og tidlig sjøvannsfase vokser virvlene som ligger bak bukhulen forholdsvis mer i lengde enn virvlene over bukhulen. Dette kan være en biologisk tilpassing til et pelagisk liv i sjøen (Fjellidal, 2005). Senere i sjøvannsfasen er veksten av virvlene som ligger over bukhulen regulert av fotoperiode (Fjellidal m.fl. 2005a).

Virveldeformasjoner

Det er vanskelig å tallfeste omfanget og den økonomiske betydningen av deformasjoner i lakseoppdrett. Larssen og Djupvik (2005) viste et gjennomsnitt på 7,5 % nedklassing pga. deformasjoner, og antydte et økonomisk tap på 2–3 kroner per kg slaktet laks. Dette gjør deformasjoner til en av de viktigste tapsfaktorene i oppdrett, og da spesielt på høstsmolt på Vestlandet.

Virveldeformasjoner kan oppstå i ulike deler av virvelsøylen og ved ulike livsstadier hos oppdrettslaks (Fjellidal m.fl. 2005b; Wargelius m.fl. 2005; Witten m.fl. 2005), og faktorer som liten smolt (Fjellidal m.fl. 2005b; Vågsholm og Djupvik, 1998), hurtig vekst (Fjellidal, 2005; Fjellidal m.fl. 2005a; Fjellidal m.fl. 2005b), feil vaksinasjonstidspunkt (Vågsholm og Djupvik, 1998; Berg m.fl. 2005), lavt fosforinnhold og biotilgjengelighet i fôr (Vielma og Lall, 1998; Albrektsen m.fl. 2005; Helland m.fl. 2005), avl (Mckay og Gjerde, 1986), fremmedstoffer (Toften og Jobling, 1996; Lower og Moore, 2003) og høy inkubasjonstemperatur (Bæverfjord m.fl. 1999; Wargelius m.fl. 2005) kan øke risikoen for slike skader.

Etter at inkubasjonstemperaturens betydning ble vist (Bæverfjord m.fl. 1999) har næringen fulgt anbefalingen om å holde temperaturen lavere enn 8 grader under eggstadiet. Innslaget av deformasjoner dannet på tidlige stadier er dermed kraftig redusert.



Figur 3: Eksempler på ryggradsdeformasjoner.

(A) Bilde av haleregionen hos laks med forkortede virvler. (B) Røntgenfotografi av haleregionen hos laks med forkortede virvler. (C) Mikro-CT-skann av en forkortet virvel. Virvelen har vokst normalt frem til en viss størrelse (traktformen). *Examples of vertebral deformities. (A) Tail region of salmon with shortened vertebrae. (B) X-ray micrograph of tail region of salmon with shortened vertebrae. (C) Micro-CT-scan of a shortened vertebra.*

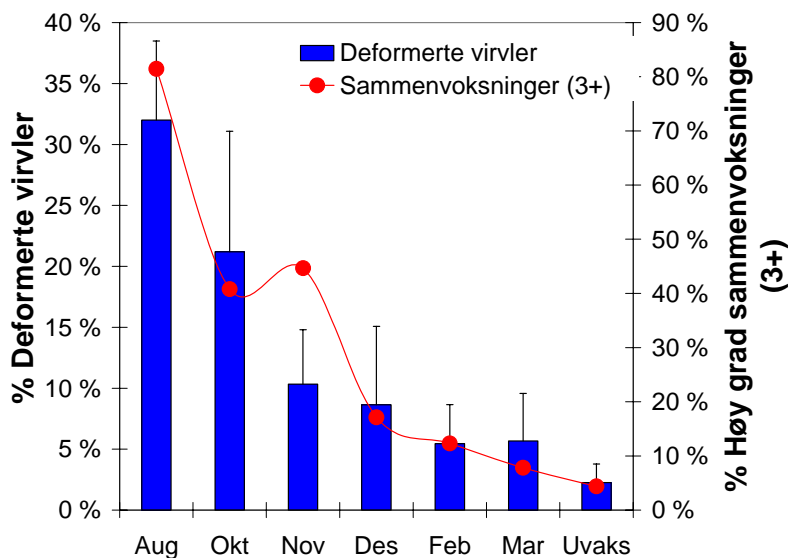
Ekspimentelle studier har vist at høstmolt har lavere innhold av mineraler og svakere ryggvirvler en vårmolt (Fjelldal 2005). Hos slakteferdig oppdrettslaks er det høyest innslag av virveldeformasjoner hos de individene som blir satt ut som høstmolt (Larssen & Djupvik 2005). Den vanligste formen for virveldeformasjon er forkortning av ryggvirvlene, spesielt i haleregionen. Forkortning av ryggvirvler skyldes forandringer i virvlenes vekstsoner, noe som har vist seg å kunne oppstå under smoltifisering eller i sjøvannsfasen (Fjelldal m.fl. 2005b; Witten m.fl. 2005). Virveldeformasjoner som oppstår tidlig i utviklingen vises ofte som større områder med sammenvokste virvler (Wargelius m.fl. 2005).

På torsk er ikke tilsvarende deformasjoner som hos laks vanlig. Det store problemet hos en del torskegrupper har vært nakkeknekk. Dette kan skyldes at svømmeblæren trykker opp mot notokorden slik at beindannelsen i nakken blir feil (Grotmol m.fl. 2005). Det er også vist at innslaget av yngel med skeiv ryggstøyle kan påvirkes av føret.

Vaksinasjon og virveldeformasjoner

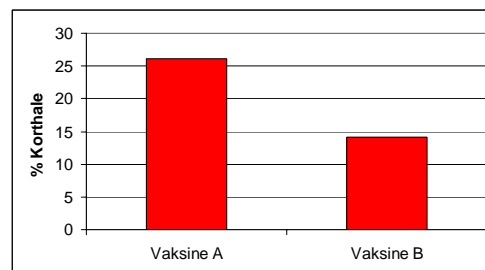
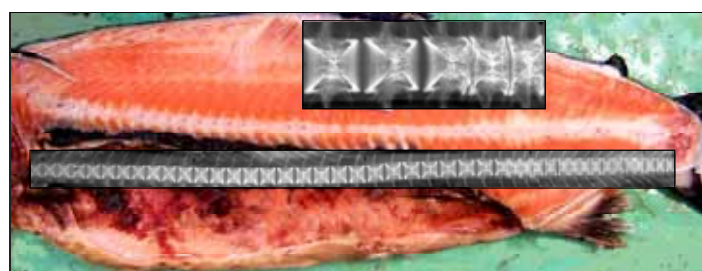
I noen forsøk ved Havforskningsinstituttet er det funnet sammenheng mellom vaksinasjon og virveldeformasjoner. I andre forsøk er det funnet at vaksinasjon har påvirket skjelettvekst, virvelmorfologi, mineralisering og/eller virvlenes fysiske egenskaper, men dette har ikke gitt seg utslag i deformasjoner som kan klassifiseres eksteriørt. I ytterligere andre forsøk har vi ikke funnet sammenheng mellom vaksinasjon og deformasjoner.

I et forsøk med vårmolt ble grupper av fisk vaksinert til ulike årstider. Gruppene som ble vaksinert høsten før utsett var minst ved vaksinerings- og ble vaksinert på høyest temperatur. Disse utviklet mest sammenvoksninger og vokste ikke like godt som uvaksinert fisk. (Berg et al. 2006).



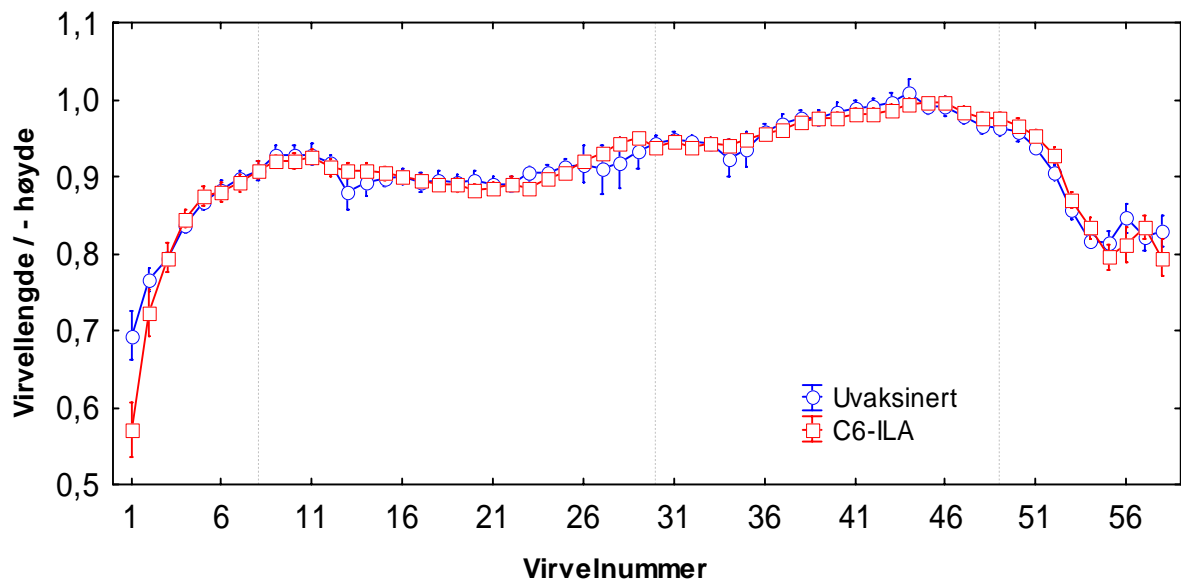
Figur 4: Effekt av vaksinasjonstidspunkt på ettårsmolt av laks på andel deformerte virvler og andel fisk med høy grad av sammenvoksning (3+ på skala fra 0–6). Gruppene vaksinert tidligst på høyest temperatur og minst fiskestørrelse fikk mest sammenvoksninger og deformasjoner. Vaksinen brukt i dette forsøket er ikke lenger i markedet. *Effect of time of vaccination on one year smolt of salmon on the percentage of deformed vertebra and percentage of fish with high degree of adherations and deformations. The vaccine used in this experiment is no longer available on the market.*

I et annet forsøk med høstsmolt ble fisk vaksinert med enten vaksine A eller B og delt i grupper som fikk ulik lysbehandling i sjø. Veksten i forsøket var god, og lysbehandlingen hadde stor innvirkning på vekstmønstre, men liten interaksjon med vaksine. Det var imidlertid stor forskjell i vekst mellom vaksinegruppene (Oppedal m.fl. 2005). Den vaksinen som hadde mest sammenvoksninger i bukhulen hadde dårligst vekst. Denne vaksinen hadde et innslag av korthaler på 26 % ved slakt, mens den vaksinen som hadde minst sammenvoksninger hadde 13 % korthaler (Berg m.fl. 2003).



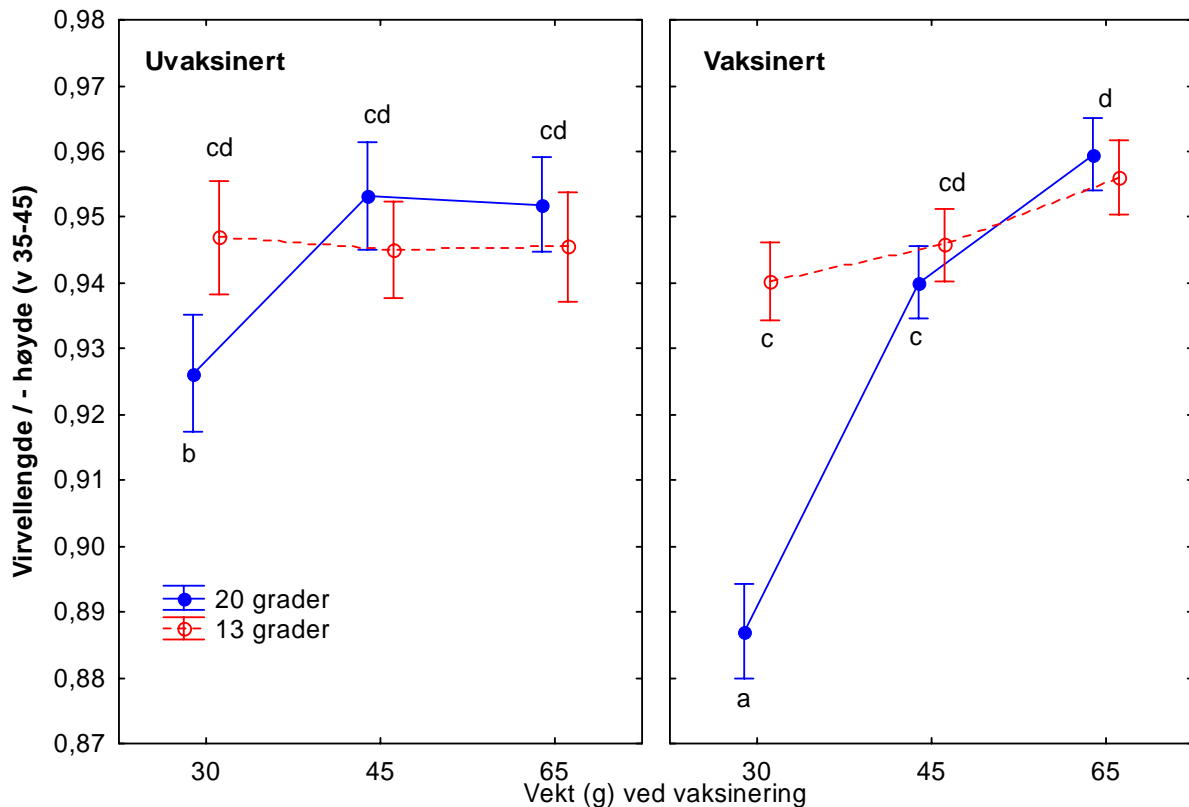
Figur 5: Andel korthaler i et forsøk med høstsmolt vaksinert med to ulike vaksiner. Vaksine A har mest sammenvoksninger, dårligst vekst og høyest andel korthaler. Dette er moderate korthaler klassifisert visuelt. Resultater for fire lysbehandlinger og de to siste uttakstidspunkt før slakt er slått sammen. *Percentage of short-tails in an experiment with autumn salmon vaccinated with two different vaccines. Vaccine A has highest percentage of adherations, lowest growth and highest percentage of short-tails. These are moderate short-tails based on visual judgement.*

I et forsøk med høstsmolt med god vekst og moderate sammenvoksninger fant vi ikke negativ veksteffekt, deformasjoner eller endringer i virvelsøylen mellom vaksinert og uvaksinert fisk. (Vedlegg 2).



Figur 6: I et forsøk med høstsmolt ble det ikke forskjell i virvelmorfologi mellom uvaksinert fisk og fisk vaksinert med en eksperimentell multivalent vaccine med ILA-komponent (C6-ILA, Intervet Norbio AS). *In an experiment with autumn salmon, no differences in vertebral morphology between unvaccinated fish and fish vaccinated with an experimental multivalent vaccine with ILA-component (C6-ILA, Intervet Norbio AS).*

I et forsøk hvor høstsmolt ble vaksinert på enten høy (20 °C) eller normal temperatur (13 °C) seks uker før utsett i sjø, utviklet høytemperaturgruppen mye sammenvoksninger. Ved slaktning fant vi ikke synlige deformasjoner. Men den minste uvaksinerte fisken fra høytemperaturgruppen hadde fått kortere virvler enn de på lav temperatur. Denne effekten av høy temperatur var forsterket på den minste fisken i den vaksinerte gruppen. Dette indikerer at en negativ miljøfaktor (høy temperatur) kan forsterkes av vaksinerings. På lav temperatur, eller på større fisk fant vi ikke denne effekten.



Figur 7: Forholdet mellom virvellengde og høyde for virvel 36–45 i fisk som har gått på høy (20 °C) og normal (13 °C) temperatur i 6 uker etter vaksinerings. Individuelt merket fisk med ulike fiskestørrelser ved vaksinerings er undersøkt 10 måneder etter vaksinerings. Høy temperatur påvirket virvelvekst i liten uvaksinert fisk, og denne effekten på liten fisk ble forsterket av vaksinerings. Bokstaver angir signifikant forskjell mellom grupper innen boksene. *Relationship between vertebral length and height for vertebrae 36-45 in fish reared at high (20 °C) and normal (13 °C) temperature for 6 weeks following vaccination. Individually targeted fish with different fish size at vaccination was examined 10 months following vaccination. High temperature influenced vertebral growth in small, unvaccinated fish, and this effect on small fish was strengthened by vaccination. Letters indicate significant difference between groups within the boxes.*

I dette, som i andre forsøk, har vi også sett at mineralraten og virvelstyrke har vært høyere i vaksinert fisk enn i uvaksinert. Normalt er det en sammenheng mellom mineralrate og virvelstyrke (Fjelldal & Grotmol 2005). I forbindelse med smoltifisering skjer det en naturlig endring med regional vekst i virvelsøylen. Når fisken vaksineres kan det bli en endring i vekstrate som påvirker virvelvekst, og som senere kan utvikle seg til deformasjoner hvis forholdene i sjø ligger til rette for det. Det er derfor ikke sikkert at høy mineralrate og styrke er normalt og bra.

Hvordan virvelvekst og eventuell sammensetning og struktur påvirkes av vaksinasjon er ikke klart. Det kan være samvirkende faktorer, påvirkning av metabolisme, hormonell regulering, eller andre mekanismer.

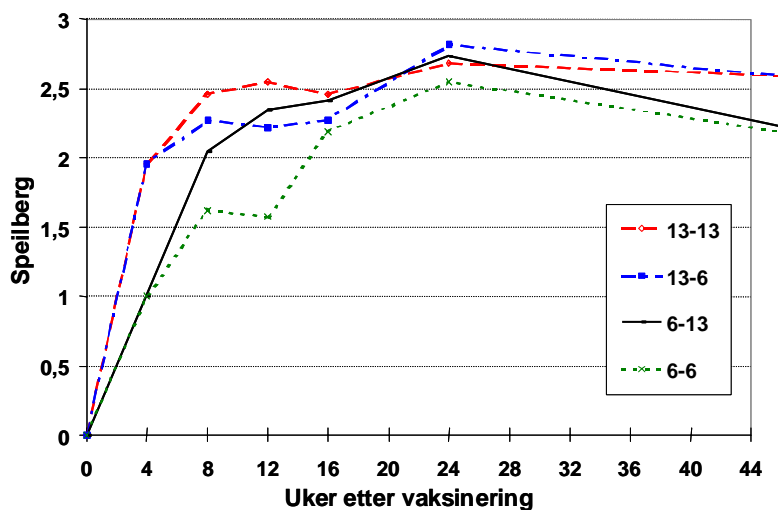
Ut fra de sammenhengene vi har sett i noen forsøk har vi prøvd å reprodusere resultatene. Det har vært vanskelig, noe som illustrerer at problemene med deformasjoner er multifaktorielt. Vaksinasjon er derfor bare en av flere faktorer som i gitte situasjoner kan utløse eller forsterke utvikling av deformasjoner hos laks. Trolig er forholdene i ferskvann avgjørende for hvordan vaksinerings påvirker virvelveksten. Smolt- og postsmoltperioden ser ut til å være viktige faser.

I de få forsøkene hvor det er blitt observert en betydelig andel deformert fisk har vaksine/vaksinasjon kunnet forklare mellom 50 % og 90 % av deformasjonene. Larssen og Djupvik (2005) undersøkte nedklassing på slaktelinje og fant at vaksintype og vaksinasjonstidspunkt, smolttype (0+, 1+) og lokalitet var viktige risikofaktorer. Totalt kunne deres modell forklare 50 % av variasjonen i deformasjoner. Den lavere, men fortsatt høye forklaringsgraden kan ha sammenheng med at det i næringen ikke finnes uvaksinert fisk som kan brukes som kontroll.

FAKTORER SOM KAN PÅVIRKE UTVIKLING AV BIVIRKNINGER

Temperatur

Temperatur ved vaksinerings og i første periode etter vaksinerings er kanskje den viktigste faktoren som styrer utvikling i sammenvoksninger. Fisk vaksinert på 13 grader fikk mer sammenvoksninger etter fire uker enn de som ble vaksinert på 6 grader. De neste fire ukene økte forskjellen mellom gruppene. Fisk som ble satt ned fra 13 til 6 grader utviklet mindre sammenvoksninger enn de som fortsatte på 13 grader, mens de som fikk økt temperaturen fra 6 til 13 grader fikk mer sammenvoksninger (Hansen 2001). Antistoffresponser og beskyttelse ble tilsvarende påvirket (Samuelsen 2002).

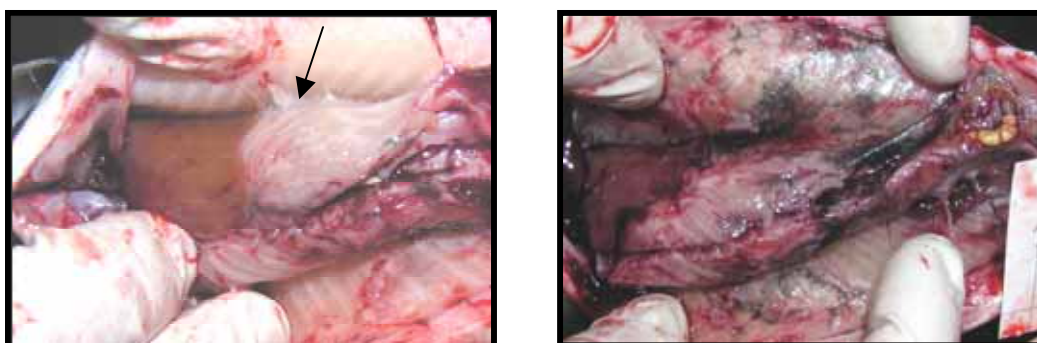


Figur 8: Effekt av temperatur ved vaksinerings og endring av temperaturen etter fire uker, på utvikling av sammenvoksninger (Speilberg) i bukholen hos laks (Hansen 2001). *Effect of temperature at vaccination and change of temperature after 4 weeks on the development of adherations (Speilberg) in salmon (Hansen 2001).*

I et forsøk hvor temperaturen ble endret fire måneder etter vaksinerings, ble det noe mer sammenvoksninger når temperaturen ble økt fra 7 til 13 grader, og noe mindre når temperaturen ble redusert til under 4 grader. Dette viser at så lenge det er et vaksinedepot er det en dynamisk balanse mellom utvikling og helning av sammenvoksninger. Denne dynamikken er også observert gjennom livssyklus ved at det er en nedgang i sammenvoksninger gjennom vinteren, mens det i løpet av sommeren øker igjen i forbindelse med økt temperatur og økt vekst (Djupvik og Vågsholm 1999; Berg m.fl. 2005). Det er likevel den første perioden etter vaksinerings som er den viktigste for etablering av sammenvoksninger (Colquhoun m.fl. 1998).

Produksjon av høstsmolt byr på store utfordringer hvis en skal unngå vaksinerings på høy temperatur. I denne produksjonen vaksineres laks ofte på liten størrelse og på høye temperaturer. Temperaturen vil også ofte være høy etter utsetting i sjø. Mange smoltprodusenter har nå satt interne standarder for maksimal temperatur ved vaksinerings, og en av vaksineprodusentene anbefaler maksimalt 15 grader ved vaksinerings. De som har mulighet til å senke ferskvannstemperaturen kan regulere dette, men fisken kan fortsatt utsettes for høye temperaturer etter utsett i sjø. Ved å utsette vaksinerings og utsett i sjø vil normalt temperaturen være lavere og fisken mindre utsatt for å utvikle sammenvoksninger.

Fordi det i næringa har vært vaksinert fisk opp til over 20 grader, har vi gjennomført et forsøk for å sammenligne vaksinerings på 20 kontra 14 grader. Fisken på 14 grader fikk normale sammenvoksninger, mens det ble mye sammenvoksninger på 20 grader. En alt for stor andel fisk fikk store skader. I 2005 er et forsøk med ulike vaksinasjonstidspunkt på 18 grader gjennomført. Også her fant vi bukhinnebetennelse i den første perioden etter vaksinerings. Denne utviklet seg til alvorlige sammenvoksninger når fisken fikk fortsette på 18 grader etter sjøsetting. Gjennomsnittlig sammenvoksnings-"score" over 3 er ikke akseptabelt i dag.



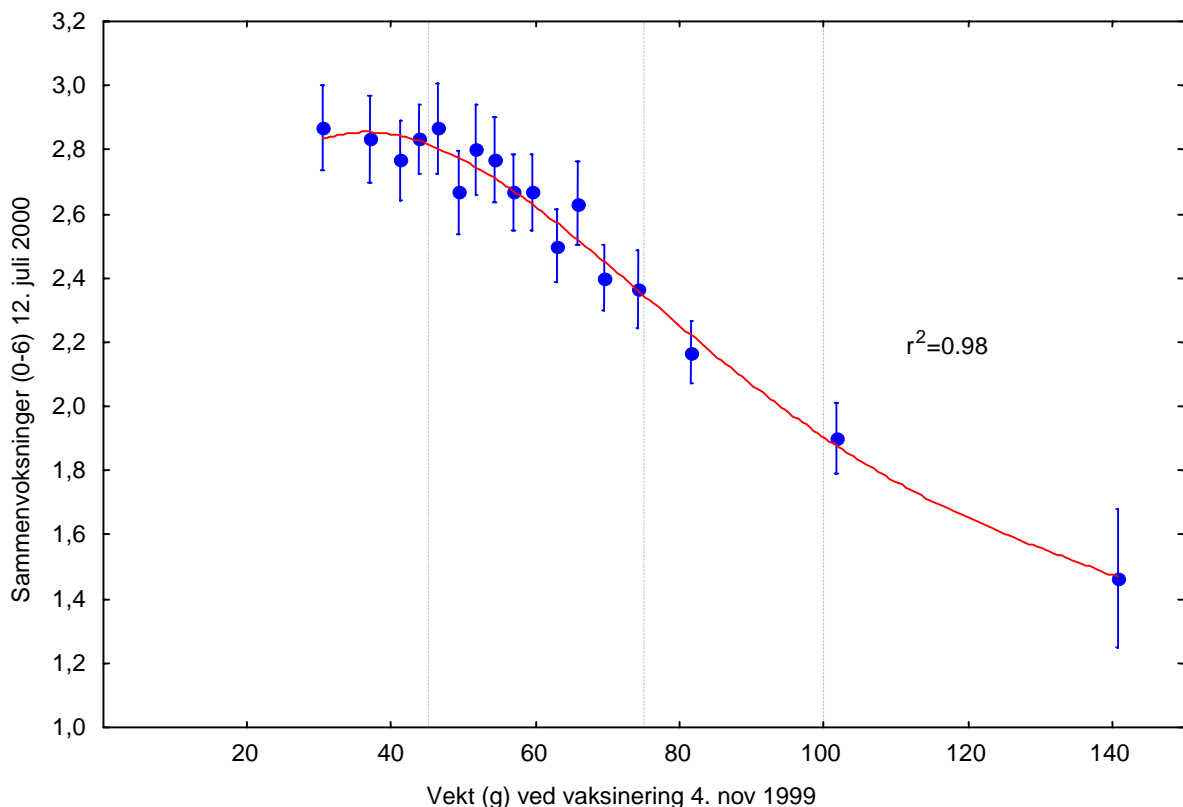
Figur 9: Bilde av normale sammenvoksninger i bukhulen etter vaksinerings av laks. Mindre tråder som hefter organer til bukvegg er vist med pil. Til høyre sjeldent eksempel på svært alvorlige sammenvoksninger med granulom og melanindeponering i organer og filet. Begge er vaksinert på 20 °C. Den til høyre viser risikoen ved vaksinerings på høye temperaturer, selv om de færreste blir som denne. Normal adhesions following vaccination of salmon. Short threads linking organs to the abdominal wall (arrow) Right: rare example of serious adhesions with granuloma and melanin deposits in organs and filet. Both individuals vaccinated at 20 °C. The right picture demonstrates the risk of vaccination at high temperatures, although only few individuals display such results .

I en høstsmoltproduksjon er perioden hvor det kan vaksineres meget begrenset fordi fisken må oppnå beskyttelse før utsetting. Dette stiller store krav til logistikk og planlegging. Det er etter hvert blitt viktig og mer vanlig å la biologiske vurderinger ligge til grunn for en samlet vaksinasjonsstrategi. Det er ikke bare leveringstidspunkt og ønsker fra matfiskanlegg som nå bestemmer logistikken, smoltanleggenes forutsetninger for å produsere smolt av god kvalitet med redusert risiko for avvikende bivirkninger er nå vel så viktige.

I produksjon av ettårssmolt har en normalt større fleksibilitet fordi fisken er større, det er lengre tid fra fisken er stor nok til vaksinerings til den skal leveres, og temperaturen gjennom vinteren er lav. Problemet for en del oppdrettere er at temperaturen kan være for lav til at de kan vaksineres. Dette gjør at det kan bli kort tid fra temperaturen stiger og den kan vaksineres og til den skal leveres. Dette kan gi problemer med oppbygging av beskyttelse.

Fiskestørrelse

I et forsøk med ulikt vaksinasjonstidspunkt på ettårs smolt fant vi mest sammenvoksninger i de gruppene som ble vaksinert tidligst. Temperaturen var da høyest og fiskestørrelsen minst (Berg m.fl 2005). Tilsvarende fant vi i et forsøk med høstsmolt hvor temperaturen var stabil (Berg & Hansen 2004). I et tredje forsøk vaksinerte vi en gruppe individmerket fisk med stor spredning i fiskestørrelse. Vi fant en klar sammenheng mellom vekt ved vaksinerings og utvikling i sammenvoksninger. I forsøket ble det brukt en vaksine som ikke lenger er i bruk (Norvaks® PROTECT IPN). Dagens vaksiner gir mindre sammenvoksninger, slik at størrelsesgrensene trolig er lavere i dag, men vi har sett at dynamikken for andre vaksiner er den samme.



Figur 10: Effekt av fiskestørrelse ved vaksinerings av laks på utvikling av sammenvoksninger. I forsøket ble det brukt individmerket ettårssmolt, vaksinert på høsten. Sammenvoksninger ble vurdert nesten to år senere. Vaksinen brukt i forsøket er ikke i bruk i dag, slik at nivået er høyere enn dagens vaksiner normalt gir. *Effect of fish size at vaccination of salmon on the development of adherations. In this experiment individually targeted one year smolts, vaccinated in the autumn was used. Adherations were measured almost two years later. The vaccine used in this trial is no more in use today, thus the level of adherations is higher than that caused by presently used vaccines.*

I et temperaturforsøk hvor både stor og liten fisk ble vaksinert på høy og lav temperatur, ble det mest sammenvoksninger på liten fisk i begge temperaturgruppene. Også i andre forsøk med enten individmerket fisk eller mellom grupper er det sammenheng mellom fiskestørrelse ved vaksinerings og utvikling av bivirkninger.

Temperatur og fiskestørrelse ved vaksinerings er to viktige faktorer som kan styres for å redusere grad av sammenvoksninger og avvikende bivirkninger. Det er i tillegg stor

individuell variasjon innen grupper med fisk. Dette betyr at det også er andre faktorer som påvirker hvordan fisken håndterer et vaksinedeponi.

En generell anbefaling er å ikke vaksinere fisk mindre enn 35 gram og ikke vaksinere over 15 grader. Det er en fordel hvis fisken er enda større og temperaturen enda lavere, men dette er en risikovurdering som den enkelte oppdretter må ta ut fra forholdene i det enkelte anlegg.

Andre biologiske og miljømessige faktorer

Avhengig av vaksinasjonsstrategi vil fisk som vaksineres ha ulik fysiologisk status avhengig av bl.a. lysregime, vekst og smoltstatus. Vannkvalitet, fisketetthet, fôring, håndtering, vannstrøm, sortering, osv. kan påvirke fisken og det generelle immunsystemet. I hvor stor grad dette eventuelt influerer på effekt og utvikling av bivirkninger er foreløpig usikkert, men det pågår forskning for å undersøke dette.

Vaksinasjonsteknologi

Årlig vaksineres om lag 160 millioner laks og ørret. Hoveddelen blir stikkvaksinert i buken med oljebaserte vaksiner. Det brukes både manuell vaksinering med håndsprøyte og vaksineringsmaskiner. Kvaliteten på arbeidet under selve vaksineringen kan ha mye å si for resultatet både med hensyn til beskyttelse og bivirkninger. Eksempelvis er stikkpunkt, nål, kalibrering av utstyr, sortering, hygiene, bedøvelse, sulting, osv. viktig for å unngå feilstikk eller manglende vaksinering. Feilstikk i filet eller inn i organ/blindsekker, dårlig hygiene, opprispet sårkant, osv. kan være med å øke grad av bivirkninger.

Her anbefales det å følge produsentenes veiledninger til vaksinering og utstyr nøye, samt at det legges enda større vekt på vaksinasjonskontroll og oppfølging (Gudding 2000; Anon 2003; Kollevåg 2005; Nygård 2005). Det er mange enkeltfaktorer som kan justeres, standardiseres og kontrolleres. Mye praktisk erfaring er samlet og ligger til grunn for anbefalingene, men det er lite publisert materiale om effekt og viktighet av ulike rutiner og vaksinasjonsprosedyrer.

Vaksinesammensetning

Vi vil i denne rapporten ikke gå nærmere inn på ulike komponenter, sammensetning og produksjon av dagens vaksiner. Vi kan bare konstatere at det kan være forskjeller mellom vaksinene mht. effekt og bieffekt. Her må vaksineprodusentene kontinuerlig arbeide for forbedring av vaksinene. For å redusere variasjon mellom grupper av fisk, er det også en utfordring å videreføre arbeid med standardisering av produksjonen for å få minst mulig variasjon mellom ulike produksjoner.

KONKLUSJON

Vaksinering av laks og ørret i oppdrett er i dag nødvendig for å unngå sykdom og dødelighet. Det er tilstrekkelig dokumentert til å fastslå at det samme vil gjelde for kveite- og torskeoppdrett. Fravær av vaksinasjon ville raskt ført til sykdomsproblemer med uakseptable konsekvenser for dyrevelferd og miljø.

Bivirkninger som oppstår som følge av vaksinasjon må reduseres så mye som mulig. Med dagens vaksiner er det på kort sikt ikke realistisk å kunne vaksinere uten bivirkninger. På lang sikt kan det sannsynligvis utvikles nye vaksinasjonskonsept med minimale bivirkninger. Arbeid med videreutvikling av konsepter som DNA-vaksinasjon og rekombinante vaksiner

bør derfor forseres, og i større grad tas i bruk av næringen. Eventuelle livssynsmessige eller politisk motiverte føringer mot bruk av slik teknologi må vektas mot dyrevelferdsmessige og miljømessige fordeler med bedre vaksineteknologi.

Det meste av laks og ørret får moderate og akseptable bivirkninger når fordeler og ulemper veies mot hverandre. Det er imidlertid en for høy andel enkeltfisk, og grupper av fisk, som har for mye bivirkninger. Det gjelder i første rekke sammenvoksninger i bukhulen og redusert vekst, og noen tilfeller hvor ryggradsdeformasjoner kan knyttes til vaksinasjon.

Utfordringene blir å bruke kunnskap om de ulike vaksiner, temperatureffekt, fiskestørrelse, vaksinasjonsteknikk, etc. til å redusere risiko for avvikende bivirkninger. Næringen har i stor grad tatt i bruk ny kunnskap for å redusere risiko, men mer kan gjøres. I denne sammenhengen er det vesentlig å sørge for at slik kunnskap finnes i det offentlige rom, og at best mulig kunnskap om bivirkninger er tilgjengelig for alle aktører i næring og forvaltning.

REFERANSER

- Albrektsen, S., Hope, B., Aksnes, A. 2005. Bioavailable P in fish meal formulated feed to Atlantic salmon smolt. In: Waagbø, Kryvi, Breck & Ørnsrud (eds). Final report NFR# 164773. Bone disorders in intensive aquaculture of salmon and cod – Workshop, NIFES, Bergen, 10-11 May 2005. p 32.
- Anon (2003) “Best practise manual” for stikkvaksinerings av laksefisk. Forte bruker støtte, ScanVacc-Novartis. 26 s.
- Anon (2005). Forskningsbehov innen dyrevelferd i Norge. Rapport fra styringsgruppa. Norges forskningsråd, ISBN 82-12-02156-4.
- Azad I.S., Shankar, K.M., Mohan C.V., Kalita B. 2000. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in indian major carps and common carp following oral vaccination-antigen localization by a monoclonal antibody. Diseases of Aquatic Organisms 43, 103-108.
- Bartussek, H., 2001. An Historical Account of the Development of the Animal Need Index ANI as Part of the Attempt to Promote and Regulate Farm Animal Welfare in Austria: An Example of the Interaction Between Animal Welfare Science and Society. Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci. Suppl. 30, 34-41.
- Berg, A., Fjellidal, PG., Harboe, T. og Meeren, Tvd. 2003. Skjelettdeformasjoner - Havforskningsinstituttets arbeid med å kartlegge årsaksforhold og løsninger. [HavforskningsTema 3-2003](#).
- Berg A., Hansen T. 2004. Vaksinasjonsstrategi for vår- og høstsmolt. I Havbruksrapport 2004. [Fisken og Havet, Særnummer 3: 40-42](#).
- Berg A, Rødseth O.M., Hansen T. 2006a. Fish size at vaccination influence the development of side-effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In Prep.
- Berg A, Rødseth OM, Tangerås A Hansen T.J. 2006b. Time of vaccination influences development of adherences, growth and spinal deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Diseases of Aquatic Organisms 69:239-248.
- Bergh, Ø. 2002. Også oppdrettstorsken kommer til å bli syk. I: Havbruksrapport 2002. Fisken og havet, særnummer 3-2002 ISSN 0802 0620. s. 90-92.
- Bergh, Ø., Nilsen, F. and Samuelsen, O.B. 2001a. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: a review. Diseases of Aquatic Organisms 48:57-74.
- Bergh, Ø., Vikanes, L., Makridis, P., Skjermo, J., Knappskog, D.H. and Rødseth, O.M. (2001b). Uptake and processing of a *Vibrio anguillarum* bacterin in *Artemia franciscana* measured by ELISA and immunohistochemistry. Fish and Shellfish Immunology 11(1):15-22.
- Bracke, M.B.M., Metz, J.H.M., Spruijt, B.M., 2001. Development of a decision support system to assess farm animal welfare. Acta Agric. Scand., A: Anim. Sci. Suppl., 30: 17-20.
- Buchmann K, Dalsgaard I, Nielsen ME, Pedersen K, Uldal A, Garcia JA, Larsen JL 1997. Vaccination improves survival of Baltic salmon (*Salmo salar*) smolts in delayed release sea ranching (net-pen period). Aquaculture 156:335-348.

- Bæverfjord, G., Lein, I., Åsgård, T., Rye, M., Storset, A., Siikavuopio, S.I. 1999. Vertebral deformations induced by high temperatures during embryogenesis in Atlantic salmon. In: Towards Predictable Quality. European Aquaculture Society Special Publication no 27: 6-7.
- Capville, J., Vessier, I. 2001. A method of assessing welfare in loose housed dairy cows at farm level, focusing on animal observations. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci. Suppl.* 30, 62-68.
- Chandross, K.P., Moccia, R.D., Duncan, I.J.H., 2004a. Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86 (3-4), 225-250.
- Colquhoun D.J., Skjerve E, Poppe T.T. .1998. *Pseudomonas fluorescens*, infectious pancreatic necrosis virus and environmental stress as potential factors in the development of vaccine-related adhesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 21:355-364.
- Dawkins, M.S., 2004. Using behaviour to assess animal welfare. *Animal Welfare* 13, 3-7.
- Egidius E. (1987) Import of furunculosis to Norway with Atlantic salmon smolts from Scotland. International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Mariculture Committee, C.M. 1987/F:8.
- Fjellidal, P.G. 2005. Growth and mineralisation of the vertebral column in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Ph.D. Thesis, University of Bergen, Norway, ISBN 82-497-0277-8.
- Fjellidal P.G. Grotmol S. (2005) Virveldeformasjoner hos atlantehavslaks [Havforskningstema 5-2005](#).
- Fjellidal PG, Nordgarden U, Berg A, Grotmol S, Totland GK, Wargelius A, Hansen T. 2005a Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. *Aquaculture* 250:516-524.
- Fjellidal, P.G., Berg, A., Hansen, T., 2005b. The development of vertebral column deformations in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) yearling smolts. *European Aquaculture Society Special Publication No. 35*: 199-200.
- FSBI. 2002. Fish Welfare. Briefing Paper 2. Fisheries Society of the British Isles. Granta Information Systems. <http://www.le.ac.uk/biology/fsbi/welfare.pdf>.
- Gjerde B, Pante M.J.R., Bæverfjord G. 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 244:77-87.
- Grotmol S., Kryvi H., Totland G.K. 2005. Deformation of the notochord by pressure from the swim bladder may cause malformation of the vertebral column in cultured Atlantic cod *Gadus morhua* larvae: a case study. *Diseases of Aquatic Organisms* 65:121-128.
- Gudding, Roar. 2000. Immunoprophylakse i veterinærmedisinen. Scandinavian Veterinary Press, Oslo. 325 pp.
- Hansen, E-K 2001. Effekt av temperatur på vaksinebivirkninger hos laks (*Salmo salar* L.). Hovedfagsoppgave, Universitetet i Bergen.
- Hart S., Wrathmell A.B., Harris, J.E. and Grayson, T.H. 1988. Gut immunology in fish: a review. *Developmental and Comparative Immunology* 12, 453-480. Erratum in *Developmental and Comparative Immunology* 13, 93-100.
- Helland, S., Refstie, S., Espmark, Å., Hjelde, K., Bæverfjord, G. 2005. Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. *Aquaculture* 250: 364-376.
- Hoel K., Lillehaug A. 1997. Adjuvant activity of polar glycopeptidolipids from *Mycobacterium chelonae* in experimental vaccines against *Aeromonas salmonicida* in salmonid fish. *Fish Shellfish Immunol* 7:365-376.
- Horne and Ellis 1988. Strategies of Fish Vaccination. In: Ellis AE (ed). *Fish Vaccination*. 55-66. London: Academic Press.
- Ingilæ M., Arnesen J.A., Lund V., Eggset G. 2000. Vaccination of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish, *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 183:31-44.
- Kacem A., Meunier F.J., and Baglinière J.L.1998. A quantitative study of morphological and histological changes in the skeleton of *Salmo salar* during its anadromous migration. *J Fish Biol* 53: 1096-1109.
- Kollestå, A. 2005. Vaksinerings av laks – hva er riktig stikkpunkt. *Intervet agenda*, 2: juni.
- Koppang E.O., Haugarvoll E., Hordvik I., Aune L., Poppe T.T. 2005. Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) white muscle. *Journal of Fish Diseases* 28:13-22.
- 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* 234:41-50.
- Krantz GE, Reddecliff JM, Heist C.E. 1964. Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. Part 1. Development of agglutinating antibodies and protective immunity. *Prog Fish-Cult* 26:3-10.

- Kvellestad A., Høie S., Thorud K., Tørud B., Lyngøy A. 2000. Platyspondyly and shortness of vertebral column in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway – description and interpretation of pathologic changes. *Diseases of Aquatic Organisms* 39:97-108.
- Larssen R.B., Djupvik H.O. 2005. Early life risk indicators of skeletal deformities in salmon at slaughter. In: Waagbø, Kryvi, Breck & Ørnsrud (eds). Final report NFR# 164773. Bone disorders in intensive aquaculture of salmon and cod – Workshop, NIFES, Bergen, 10-11 May 2005. [p 10-11, 36](#).
- Lillehaug A., Lunestad B.T., Grave K. 2003. Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture – a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Diseases of Aquatic Organisms* 53:115-125.
- Lower, N., Moore, A. 2003. Exposure to insecticides inhibits embryo development and emergence in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 431-432.
- Lund R.A., Midtlyng P.J., Hansen L.P. 1997. Post-vaccination intra-abdominal adhesions as a marker to identify Atlantic salmon, *Salmo salar* L., escaped from commercial fish farms. *Aquaculture* 154:27-37.
- Madsen I., Arnbjerg J., Dalsgaard I. 2001. Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. *Aquaculture Research* 32:235-241.
- Mckay L.R., Gjerde B. 1986. Genetic variation for a spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 52: 263-272.
- Meunier, F.J. 2002. Skeleton. In: Panfili, J., de Pontual, H., Troadec, H., Wright, P.J. (Eds.), *Manual of Fish Sclerochronology*. Ifremer-IRD co edition, Brest, pp 65-87.
- Midtlyng P.J. 1996. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology* 6:553-565.
- Midtlyng P.J., Reitan L.J., Lillehaug A., Ramstad A. 1996a. Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish and Shellfish Immunology* 6:599-613.
- Midtlyng P.J., Reitan L.J., Speilberg L. 1996b. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology* 6:335-350.
- Midtlyng P.J. 1997. Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. In: Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (eds) *Fish vaccinology*. *Development Biological Standardisation* 90:371-379.
- Midtlyng P.J. 1998. Evaluation of furunculosis vaccines in Atlantic salmon. Experimental and field studies for assessment of protection and side-effects. Dr.scient.-thesis, Norwegian Veterinary College, Oslo.
- Midtlyng, P.J., Lillehaug, A. 1998. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Diseases of Aquatic Organisms* 32:91-97.
- Mikkelsen H., Schøder M.B., Lund V. 2004. Vibriosis and atypical furunculosis vaccines; efficacy, specificity and side effects in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture* 242:81-91.
- Mutoloki S., Alexandersen S., Evensen Ø. 2004. Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Fish and Shellfish Immunology* 16: 633-644.
- Mutoloki S., Brudesth B., Reite O.B., Evensen Ø. 2006. The contribution of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to the induction of inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with oil-based vaccines. *Fish and Shellfish Immunology* 20:1-11.
- Mørkøre T., Rørvik K-A. 2001. Seasonal variation in growth, feed utilisation and product quality of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred to seawater as 0+ smolts or 1+ smolts. *Aquaculture* 199: 145-158.
- Nordgarden U., Oppedal F., Taranger G.L., Hemre G.-I., Hansen T. 2003. Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) I – Growth and feed conversion ratio. *Aquaculture Nutrition* 9: 287-293
- Nordvik, K., Kryvi, H., Totland, G.K., Grotmol, S. 2005. The salmon vertebral body develops through mineralization of two preformed tissues that are encompassed by two layers of bone. *Journal of Anatomy* 206: 103-114.
- Nygård S. 2005. Evaluering av noen vaksineringsmaskiner. *Intervet agenda*, 2: mai.
- Oppedal F., Taranger G.L., Juell J.E., Fosseidengen J.E., Hansen T. 1999. Growth, osmoregulation and sexual maturation of underyearling Atlantic salmon smolt *Salmo salar* L. exposed to different intensities of continuous light in sea cages. *Aquaculture Research* 30. 491-499.
- Oppedal F., Berg A., Olsen R.E., Taranger G.L., Hansen T. 2006. Photoperiod in seawater influenced seasonal growth and chemical composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. *Aquaculture* 254:396-410.
- Poppe T.T., Breck O. 1997. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms* 29:219-226.

- Poppe T.T., Barnes A.C., Midtlyng P.J. 2002. Welfare and ethics in fish farming. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22:148-151.
- Pykkö P., Lyytikäinen T., Ritola O., Pelkonen S. 2000. Vaccination influences growth of Arctic charr. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:77-80.
- Quentel, C. and Vigneulle M. 1997. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In Gudding R., Lillehaug A., Midtlyng PJ, Brown F (Eds.) *Fish Vaccinology. Developments in Biological Standardization*. Pp. 69-78.
- Rose, J.D. 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Reviews in Fisheries Science* 10: 1-38.
- Rønsholdt B., McClean E. 1999. The effect of vaccination and vaccine components upon short-term growth and feed conversion efficiency in rainbow trout. *Aquaculture* 174:213-221.
- Samuelsen, O. 2002. Effekt av temperatur på spesifikk immunrespons hos laks (*Salmo salar* L.) Hovedfagsoppgave, Universitetet i Bergen, 88 s.
- Samuelsen O.B., Nerland A., Svåsand T., Jørgensen T., Schrøder M., Bergh Ø 2006. Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua* their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:239-254.
- Silverstone A.M., Hammel L. 2002. Spinal deformities in farmed Atlantic salmon. *Can Vet J* 43:782-784
- Sneddon L.U., Braithwaite V.A., Gentle M.J.. 2003. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270: 1115-21.
- Sohlberg, S., Mejdell, C., Ranheim, B., Søli, N. 2004. Oppfatter fisk smerte, frykt og ubehag? En litteraturgjennomgang. *Norsk veterinærtidsskrift* 6, 429-438.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. 1995. *Biometry*. Freeman, New York, 887 p.
- Sommerset I., Krossøy, B., Biering, E. and Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines* 4(1), 89-101.
- Storebakken T., Austreng, E. 1987. Ration levels for salmonids II. Growth, feed intake, protein digestibility, body composition, and feed conversion in rainbow trout weighing 0.5-1.0 kg. *Aquaculture*: 60: 207-221.
- Sørnum U., Damsgård, B. 2004. Effects of anaesthetization and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 232:333-341.
- Takle H., Baeverfjord G., Lunde M., Kolstad K., Andersen Ø. 2005. The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Aquaculture* 249:515-524.
- Toften H., Jobling M. 1996. Development of spinal deformities in Atlantic salmon and Arctic charr fed diets supplemented with oxytetracycline. *J Fish Biol* 49:668-677.
- Turnbull, J., Bell, A., Adams, C., Bron, J. & Huntingford, F. 2004. Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic salmon: application of a multivariate analysis. *Aquaculture*, 243, 121-132.
- Vielma J., Lall S.P. 1998. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater is not influenced by higher dietary calcium intake. *Aquaculture* 160:117-128.
- Vågsholm I., Djupvik H.O. 1998. Risk factors for spinal deformities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 21:47-53.
- Vågsholm I., Djupvik H.O. 1999. Risk factors for abdominal adhesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 22:53-58.
- Wargelius A., Fjellidal P.G., Hansen T. 2005. Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Development Genes and Evolution* 215: 350-357.
- Witten P.E., Gil-Martens L., Hall B.K., Huysseune A., Obach A. 2005. Compressed vertebrae in Atlantic salmon *Salmo salar*: evidence for metaplastic chondrogenesis as a skeletogenic response late in ontogeny. *Diseases of Aquatic Organisms* 64:237-246.
- Ørnsrud R., Graff I.E., Hoie S., Totland G.K., Hemre G.I. 2002. Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 8: 7-13.

VEDLEGG 1: SKJULT MELANIN I FILÉT

Ikke sammenheng mellom vaksinering, sammenvoksninger og skjult melanin i filét i 4 undersøkte forsøk.

Arne Berg¹, Dag Knappskog², Niels Petter Maaseide² og Tom Hansen¹

Bakgrunn

Vaksinering med effektive oljebaserte vaksiner er kjent å gi melanin (svarte flekker) på organer og på bukhinnen. Ofte er det mer melanin hos fisk med mye sammenvoksninger, og i enkelte tilfeller går melaninflekken på bukveggen også inn i filéten slik at den ikke kan fjernes på slaktelinjen, noe som fører til nedklassing. Melanin og misfarging i buk og filét er kjent også fra tiden før vaksinering ble introdusert. Melanin er et vanlig pigment i de fleste organismer (hud og hårfarge). Det er vanlig med melanisering i forbindelse med infeksjoner på grunn av tilstrømming av bl.a. melanomakrofager. Melanin i bukhulen i etterkant av vaksinering er derfor ikke uventet.

I den senere tid har melaninflekker i filéten blitt et økende problem i norsk oppdrett. Grovt sett kan melanin deles i to grupper: Det som kan sees i bukhulen ved sløyging, og det som ligger i filéten og ikke oppdages før filetering (skjult melanin). Innslaget av skjult melanin er undersøkt i 4 forsøk ved Havforskningsinstituttet. På slaktelinje er et utvalg fisk filetert, og forekomst, utbredelse, og lokalisering av melanin i filét er registrert.



Figur 1. Normalt melanin etter vaksinering i bukhulen (a) skjult melanin i filét. Flekken sees ikke før fisken er filetert. (b) Melaninstriper langs ribben, her på uvaksinert fisk (c) *Normal melanin following i.p. vaccination (a), hidden melanin in filet, not recognised before the fish is fileted (b), Melanin lines along ribs, here shown on an unvaccinated fish (c)*

Forsøksoppsett forsøk 1 – Vaksinetest 2000

Vårsmolt av laks (n=20.000) ble vaksinert med 1 av 7 vaksiner 14 mars 2001 (vaksiner fra ulike leverandører). En gruppe ble holdt uvaksinert. Smolten ble transportert med brønnbåt til 2 merder (12 x 12 x 12 m) ved Havforskningsinstituttet Matres lokalitet på Solheim 3 mai. I forbindelse med slakt 10 april 2002 ble fisken lengdemålt, veid, blodprøve til antistoff ble tatt, og sammenvoksninger i bukhulen ble vurdert. Noe av fisken ble filetert og mengde, type og lokalisering av skjult melanin ble registrert (n=155). Det ble tatt prøve til histologi av melaninflekker, samt at det ble tatt røntgen av ryggrader.

¹ Havforskningsinstituttet, 5984 Matredal.

² Intervet Norbio AS, Thormøhlensgt 55, 5008 Bergen

Korrespondanse: arne.berg@imr.no

For å teste beskyttelse, ble noe av fisken holdt på land i kar med filtrert sjøvann (Ø 3 m, 0,7 m dyp) og ikke overført til merd. Ved forsøkets slutt ble den resterende fisken (n=133) filetert på samme måte som fisken som hadde gått i merd.

Sammenvoksningsnivå ble klassifisert på en skala fra 0 (ingen sammenvoksningsnivå) til 6 (svært mye sammenvoksningsnivå og melanindeponering) (Midtlyng m.fl. 1996). Melanin i bukshulen ble klassifisert slik: 1: Melanin på organer, 2: Melanin på bukshinne, men som kan fjernes, 3: Melanin på bukshinne som går inn i filét, og ikke kan fjernes. Klassifiseringen sier derfor nødvendigvis ikke noe om mengden. Skjult melanin ble undersøkt ved at fisken ble filetert, og bukshinne/ribbein ble fjernet. Venstre og høyre filét ble delt i 6 felt. Antall melanin flekker og ca areal i hvert felt ble registrert.

Forsøksoppsett forsøk 2 – DOSETID01

Individmerket laks (n=1100) med stor størrelsesspredning ble vaksinert med 0,05 ml, 0,1 ml (normal dose) eller 0,4 ml Norvax[®] Compact 6 den 26 september 2001 eller 20 februar 2002. Noe fisk ble holdt uvaksinert. Fisken ble flyttet til en merd (5 x 5 x 7 m) på Havforskningsinstituttet Matres lokalitet på Matre 13 mai 2002. Ved forsøkslutt 20 februar 2003 ble den resterende fisken lengdemålt, veid, blodprøver ble tatt og sammenvoksningsnivå klassifisert. Skjult melanin ble vurdert som i forsøk 1. Ryggraden ble røntgenfotografert.

Forsøksoppsett forsøk 3 – LYSTID02

For å undersøke optimalt vaksinasjonstidspunkt for høstmolt, ble laks fordelt på 16 kar med 4 ulike lysregimer, inkl kontinuerlig lys den 27 juni 2002. I hvert lysregime ble fisk vaksinert ved ulike tidspunkt før sjøvannsutsetting 8 oktober 2002 (11, 7, 5 og 3 uker). I tillegg ble en uvaksinert gruppe inkludert pr. lysregime. Det ble brukt 0,1 ml Norvax[®] Compact 6 ved vaksineringsnivå.

Ved slakt den 1 oktober 2003 ble fisken (n=719) vurdert tilsvarende som i forsøk 1.

Forsøksoppsett forsøk 4 – TEMP03

I næringen blir det ofte brukt høy temperatur under vaksineringsnivå av høstmolt. Det er tidligere vist at høy temperatur gir mer sammenvoksningsnivå enn lav temperatur (Hansen 2001, Berg m.fl. 2006a,b), og at liten fisk lettere utvikler alvorlige sammenvoksningsnivå (Berg m.fl. 2006a,b). Det ble derfor satt opp et forsøk med høy og normal temperatur (20 °C og 14 °) i ferskvann fra vaksineringsnivå til sjøsetting (6 uker). Høstmolt av laks med stor størrelsesspredning ble individmerket med TROVAN. Den 1. september 2003 ble halvparten av fisken vaksinert med 0,1 ml Norvax[®] Compact 6 og fordelt på de to temperaturene. De resterende forble uvaksinert. Fisken ble overført til en merd (5 x 5 x 7 m) på Havforskningsinstituttet Matres lokalitet på Matre. Ved forsøkslutt 26 august 2004 ble resterende fisk (n=283) lengde målt og veid, sammenvoksningsnivå vurdert, tatt blod av og skjult melanin ble vurdert som i forsøk 1. Ryggraden ble røntgenfotografert.

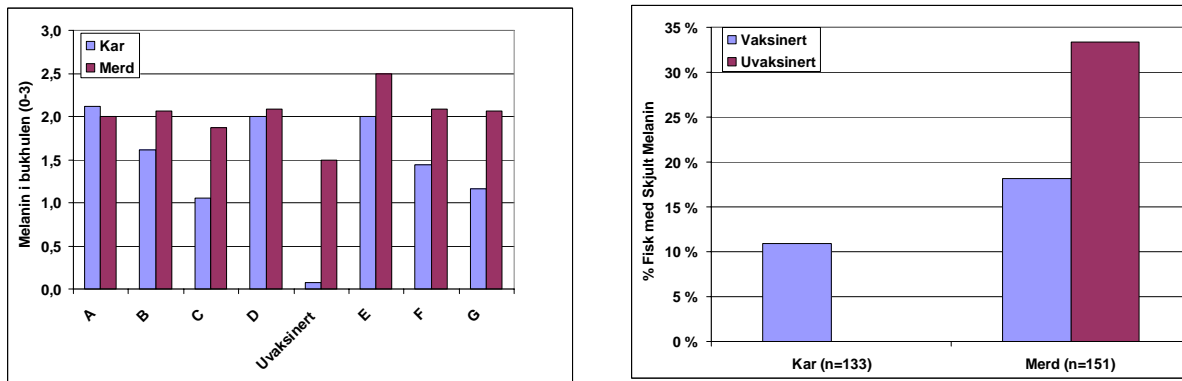
Resultat

Forsøk 1

Grad av sammenvoksningsnivå og melanin i bukshulen var noe høyere for fisk som hadde gått i merd enn fisken i kar på land, og fisken i merd hadde vokst best. I merd hadde også

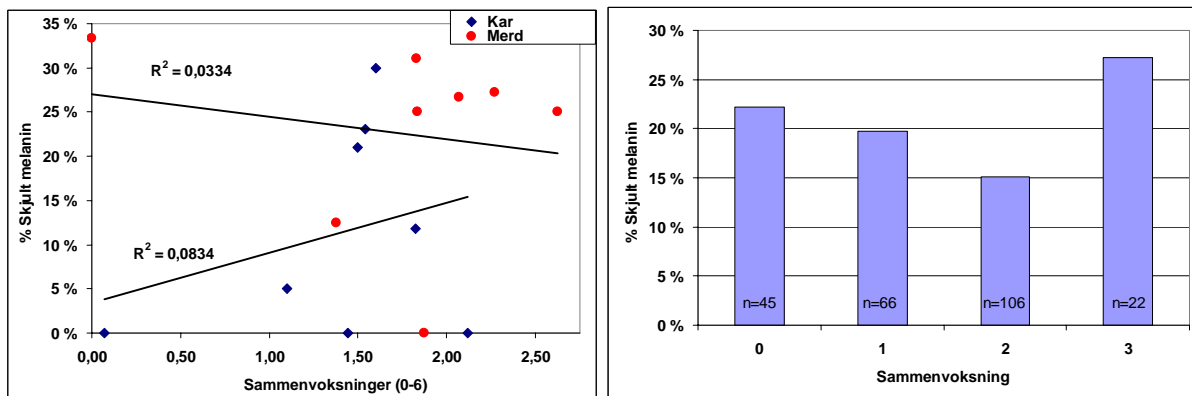
uvaksinert fisk melanin i bukchulen. Tilsvarende ble ikke funnet hos fisk som hadde gått i kar på land.

Det ble funnet mer skjult melanin på fisken som gikk i merd, i forhold til fisk som gikk i kar på land ($p < 0,01$). Skjult melanin ble observert både på vaksinert og uvaksinert fisk i merd, og det var ikke forskjell i innslaget av skjult melanin mellom gruppene. På fisken som gikk i kar på land ble det ikke observert skjult melanin på uvaksinert fisk. Antall prikker og omfanget an melanin varierte usystematisk fra fisk til fisk, uavhengig av gruppe.



Figur 2 Melanin i bukchulen på fisk vaksinert med ulike vaksiner, og i uvaksinert fisk, som har gått i sjøvann i merd eller i kar (til venstre). Andelen skjult melanin i filét på vaksinert og uvaksinert fisk i merd og kar (til høyre) *Melanin on fish vaccinated with different vaccines, and in unvaccinated fish which has been reared in seawater in net pen or tank (left). Percentage hidden melanin in filets on vaccinated and unvaccinated fish in net pen and tank (right)*

Det ble ikke observert noen sammenheng mellom sammenvoksninger og andel skjult melanin, verken innad i gruppene eller mellom grupper i kar eller i merd.

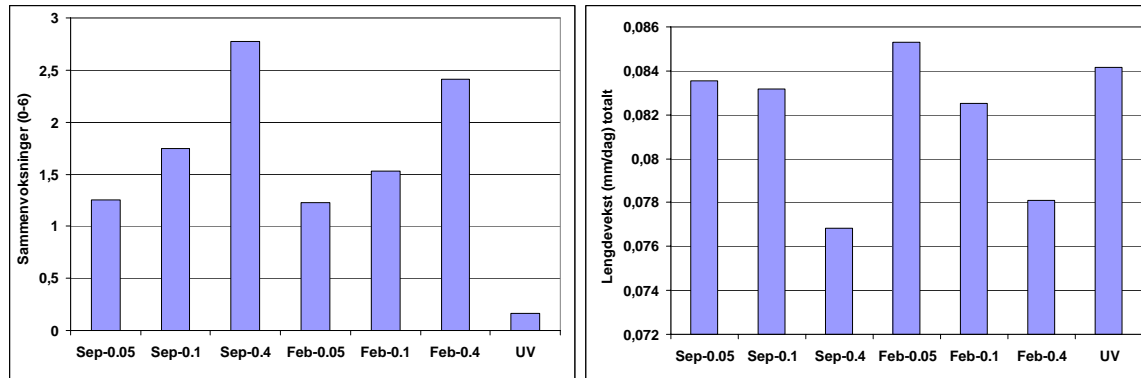


Figur 3. Grad av sammenvoksninger i bukchulen mot andel skjult melanin i filét for 7 vaksinegrupper og en gruppe uvaksinert fisk, som har gått på sjø i kar eller merd (til venstre). Andel skjult melanin i filét fordelt på grad av sammenvoksninger i bukchulen (til høyre). *Percentage of adherations vs. percentage of hidden melanin in filets for 7 vaccine groups and one group of unvaccinated fish, reared in seawater in net pen or tank (left). Percentage of hidden melanin in filets distributed on the degree of adherations (right).*

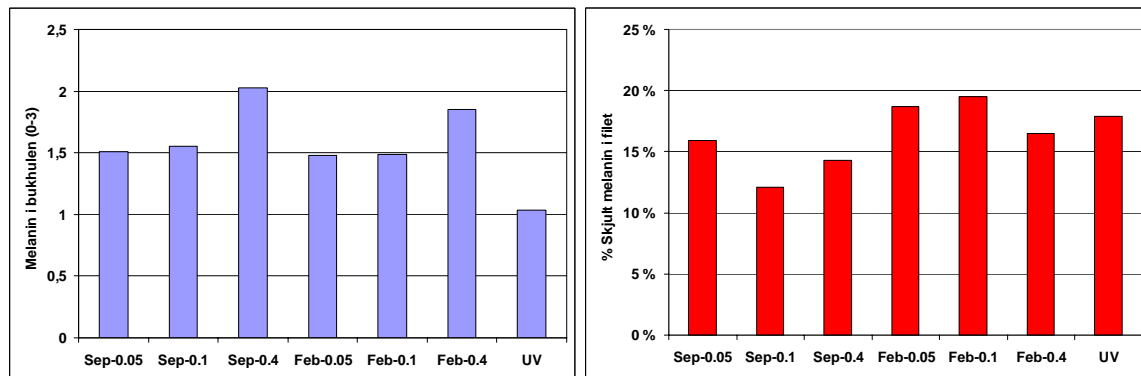
Forsøk 2

Det var stor forskjell i grad av sammenvoksninger mellom behandlingene (injisert dose, fiskestørrelse), varierende fra 1,2 til 2,8. Det var også redusert vekst i gruppene som fikk firedobbel anbefalt dose (0,4 ml).

Skjult melanin ble registrert på 16% av fisken. Det var ingen forskjell mellom gruppene, eller korrelasjon med sammenvoksninger.

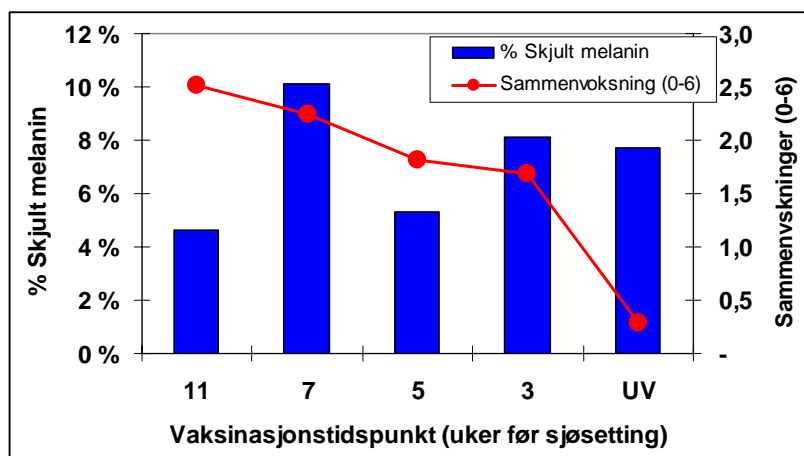


Figur 4. Grad av sammenvoksninger ved slakt (Venstre), og lengdevekst pr dag fra vaksinering (høyre), i grupper av fisk som er vaksinert til ulik tid (Feb eller Sep), med ulik injisert vaksinedose (0,05, 0,10 eller 0,40 ml) eller er holdt uvaksinert. *Degree of adherations at slaughter (left) and growth (length) per day from vaccination (right) in groups of fish vaccinated at different times (February or September.) with different i.p. dose of vaccine (0,05, 0,10 or 0,40 ml) or unvaccinated*



Figur 5. Gjennomsnittlig melanin i bukshulen (til venstre), og andel fisk med skjult melanin i filét (til høyre) i grupper av fisk som er vaksinert til ulik tid (Feb eller Sep), med ulik injisert vaksinedose (0,05, 0,10 eller 0,40 ml) eller er holdt uvaksinert. *Average melanin (left) and percentage of fish with hidden melanin in file (right) in groups of fish vaccinated at different times (February or September), with different i.p. dose of vaccine (0,05, 0,10 or 0,40 ml) or unvaccinated*

Forsøk 3



Figur 6. Andelen skjult melanin i filét (søyle) og grad av sammenvoksninger i bukhulen (linje) for høstsmolt av laks vaksinert til ulik tid før smoltifisering og sjøsetting. *Percentage of hidden melanin in fillet (bars) and degree of adhesions (line) for autumn smolts of salmon vaccinated at different times prior to smoltification and transfer to sea.*

Andel fisk med skjult melanin var i gjennomsnitt 7%, men kunne ikke knyttes til behandling eller grad av sammenvoksning. Gruppene som ble vaksinert tidligst, ved minst fiskestørrelse, hadde mest sammenvoksninger og ble minst.

Forsøk 4

Det ble funnet skjult melanin i 6% av fisken. Det var ikke forskjell mellom vaksinert og uvaksinert fisk (hhv 6,5% og 5,1%), eller korrelasjon med grad av sammenvoksninger. Gruppene som ble vaksinert tidligst hadde mest sammenvoksninger og lavest vekstrate.

OPPSUMMERING

Forsøkene viser at forekomst av skjult melanin i filét i disse forsøkene ikke er knyttet til om fisken er vaksinert eller ikke. Andel skjult melanin samvarierer heller ikke med grad av sammenvoksninger, eller melanin i bukhulen på vaksinert fisk.

I forsøk 1 var det mer melanin, både synlig og skjult, på fisk som gikk i merd i sjø i forhold til de som fikk sjøvann i kar på land.

Koppang m.fl. (2005) undersøkte melaninflekker på slaktelinje og fant at disse sannsynligvis var vaksinerelatert. Ut fra våre resultater bør man se etter andre årsaksammenhenger i tillegg. Behandling, smittebelastning og/eller miljøforhold kan ha påvirket innslaget av skjult melanin. Dette understøttes av at vi har funnet skjult melanin også i uvaksinert fisk, og at fisk i merd fikk mer melanin enn tilsvarende fisk som gikk i kar på land

Forsøkene er gjennomført av Havforskningsinstituttet som en del av industriprosjektet "Optimal vaksinasjonsstrategi for reduserte bivirkninger" finansiert av Intervet Norbio AS

REFERANSER

- Berg A., Rødseth, O.M., Hansen T. (2006a) Fish size at vaccination influence the development of side-effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Manuskript
- Berg A.E., Rødseth O.M., Tangerås A. Hansen T. (2006b) Time of vaccination influences development of adherences, growth and spinal deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Diseases of Aquatic Organisms* 69:239-248.
- Hansen, E-K (2001) Effekt av temperatur på vaksinebivirkninger hos laks (*Salmo salar* L.). Hovedfagsoppgave, Universitetet i Bergen
- Koppang EO, Haugarvoll E, Hordvik I, Aune L., Poppe T.T. 2005. Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.) white muscle. *Journal of Fish Diseases* 28:13-22
- Midtlyng P.J., Reitan L.J., Speilberg L 1996b. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology* 6:335-350

VEDLEGG 2: VAKSINASJONSFORSØK HØSTSMOLT

Vekst, sammenvoksninger, melanindeponering, muskel- og ryggradsvekst i forsøk med ILA-vaksinert og uvaksinert fisk.

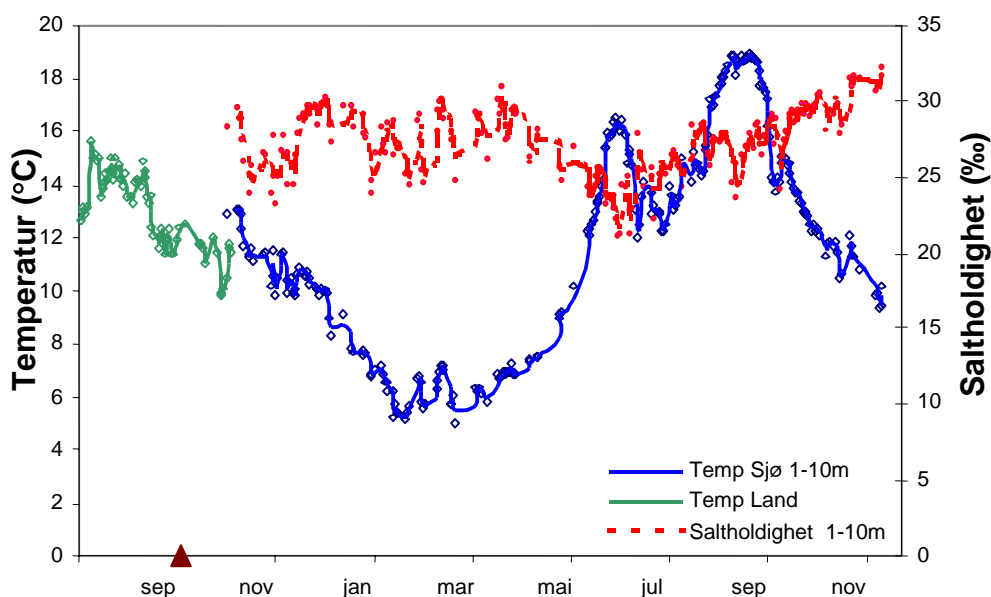
Arne Berg¹, Arild Tangerås² og Tom Hansen¹

1. Havforskningsinstituttet, Matredal
2. Intervet Norbio, Bergen

Forsøksoppsett

Grupper med høstsmolt av laks (totalt 9027 fisk med snittvekt 68 g) ble vaksinert 17-18 september 2001 med 1: Intervet Norbios vaccine Norvax® Compact 6 (C6), 2: Compact 6 som i tillegg inneholdt en komponent mot ILA (C6-ILA), eller 3: en vaccine med samme adjuvant, men som kun inneholdt ILA-komponent (C-ILA). I tillegg ble en gruppe holdt uvaksinert. Etter vaksinerings gikk fisken i et kar med kontinuerlig lys (Ø 5 m). Den 19 oktober 2001 ble fisken transportert med brønnbåt til en merd i sjø (12 x 12 x 12 m) på Havforskningsinstituttet Matres lokalitet på Solheim.

Temperatur i forsøket fremgår av figur. Temperatur ved vaksinerings var 12 °C. Total dødelighet under hele forsøket var under 1%.



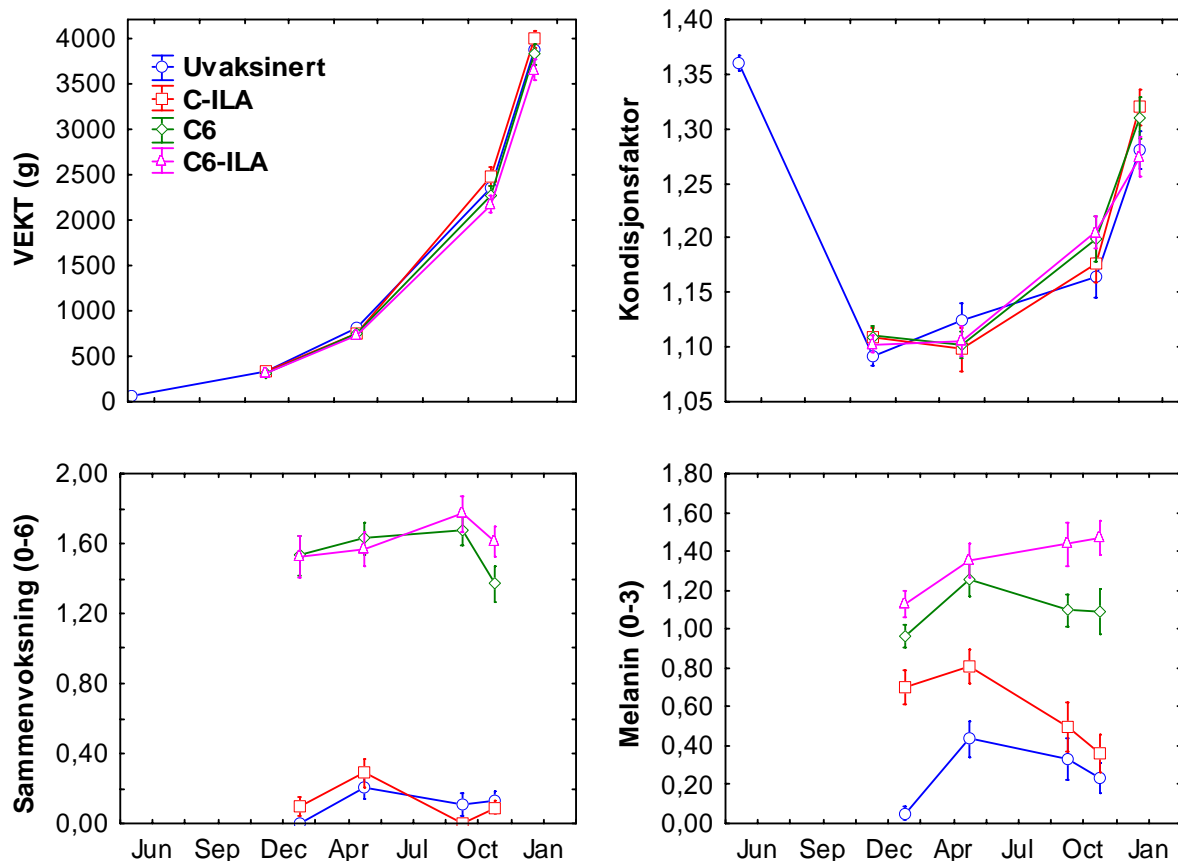
Figur 1. Temperatur og saltholdighet i vaksinasjonsforsøk med høstsmolt. Pil angir vaksinasjonstidspunkt. *Temperature and salinity in vaccination experiment with autumn salmon. Arrow: time of vaccination.*

Vekst og sammenvoksninger ble undersøkt 18, 32 og 50 uker etter vaksinerings, samt ved slakt den 5. desember 2002 som var 63 uker etter vaksinerings. Da ble 95% klassifisert som superior og 2% som ordinær.

Ved slakt ble deformasjoner klassifisert visuelt, samt at et utvalg fra uvaksinert fisk og fra C6-ILA gruppen ble filetert og tatt røntgen av (n=15 fra hver). Ut fra røntgenbildene ble virvelform og avstand mellom virvlene målt.

Resultat

Fisken vokste godt og veide $3,8 \pm 0,06$ kg (SEM) ved slakt. Gruppen vaksinert med C-ILA ble størst og C6-ILA ble minst, men det var ikke signifikant forskjell mellom gruppene, verken mht lengde, vekt eller kondisjonsfaktor ($p > 0,18$).

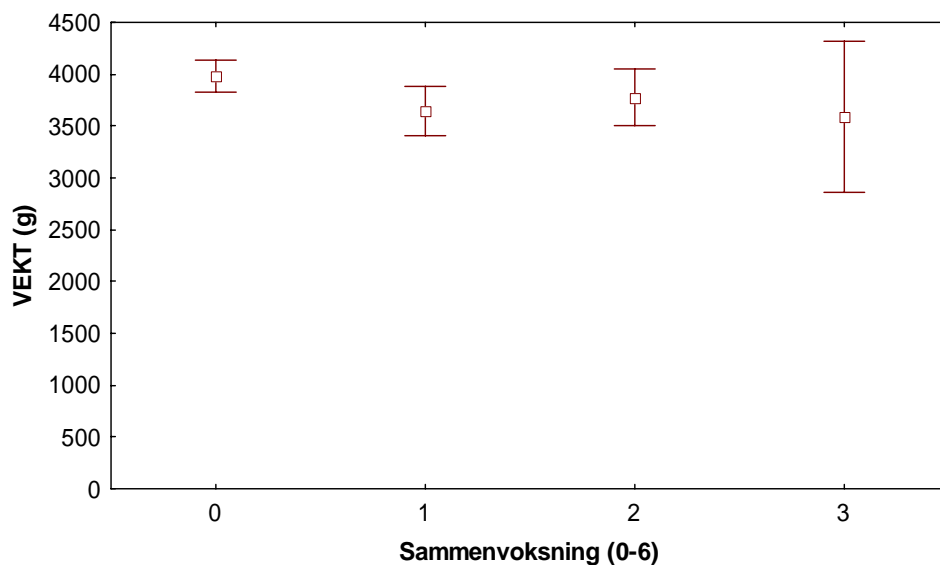


Figur 2 Vekt, kondisjonsfaktor, sammenvoksninger i bukhalen og melanin i bukhalen hos høstsmolt av laks som er uvaksinert eller vaksinert med ulike vaksiner. Feilfelt angir standard feil. *Weight, condition factor, adhesions and melanin in autumn salmon which is unvaccinated or vaccinated with different vaccines. Standard errors are shown.*

Det ble observert liten grad av sammenvoksninger i gruppen vaksinert med C-ILA, og denne var ikke signifikant forskjellig fra den uvaksinerte. Ved obduksjon var det ofte vanskelig visuelt å skille fisk i denne gruppen fra uvaksinert fisk. Gruppene som var vaksinert med C6 eller C6-ILA hadde ved slakt en bivirknings skår på hhv 1,4 og 1,6 ($\pm 0,09$ SEM), noe som anses som moderat / lavt. Det var ikke signifikant forskjell mellom disse to gruppene.

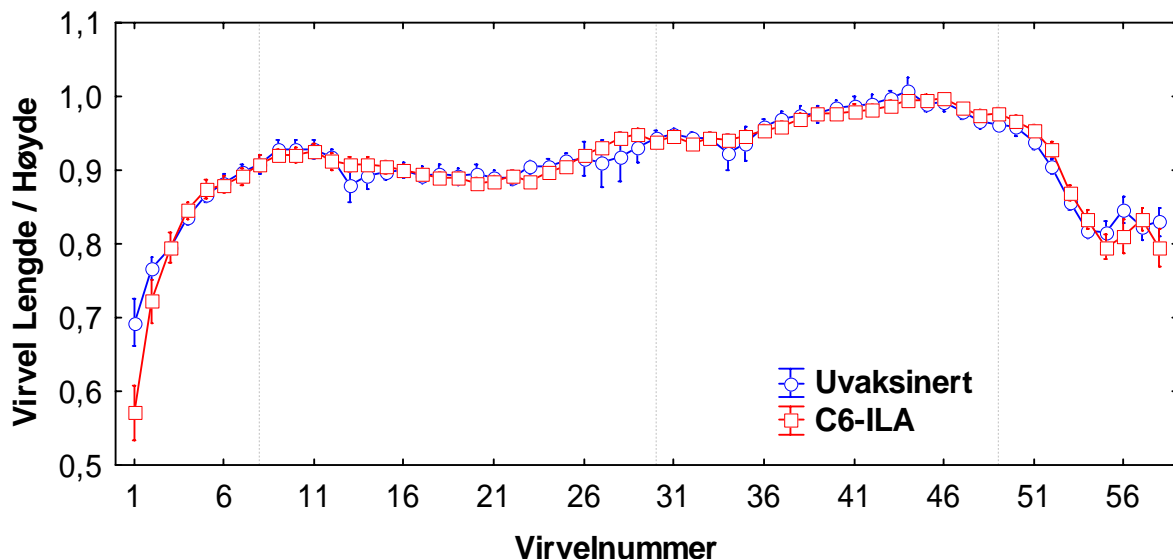
Melanin i bukhalen og på organene var noe høyere i C-ILA gruppen enn i kontrollgruppen ved de to første uttakene, men ikke ved senere uttak. C6 og C6-ILA gruppene hadde høyere nivå av melanin enn C-ILA vaksinert og uvaksinert fisk, og ved slakt hadde C6-ILA gruppen høyere skår for melanin enn C6 gruppen ($p < 0,03$).

Ved slakt ble det ikke funnet sammenheng mellom grad av sammenvoksninger og fiskens vekt, verken innad i gruppene (forklaringsgraden $r^2 < 0,05$), eller på materialet som helhet ($r^2 < 0,02$).



Figur 3. Vekt ved forsøketts slutt for fisk som har fått ulik skåre med sammenvoksninger i bukhulen. Alle 4 gruppene er slått sammen. Feilfelt angir 95% konfidensintervall. *Weight at termination of experiment of fish with different scores of adhesions. All four groups are pooled. Error indicates 95% confidence interval.*

Ved slakt ble 1 av 269 fisk klassifisert som korthale. Ved måling av ryggvirvlene på røntgenbilder ble det funnet deformerte virvler i to uvaksinerte fisk og en C6-ILA vaksinert fisk. Det var således ($r^2 < 0,02$), ingen effekt av vaksineringsverken på virvelmorfologi eller avstand mellom virvler.



Figur 5. Forholdet mellom virvelhøyde og virvellengde for to av forsøksgruppene (n=15 pr gruppe). Virvelnummer 1 er fremme på fisken. *The relationship between vertebral height and vertebral length in two experimental groups (n=15 per group) Vertebra number 1 is posterior.*

DISKUSJON

I forsøket hadde fisk i alle gruppene god vekst. Grad av bivirkninger var normalt, og bruk av ILA-komponent i vaksinen, slik at det ble en 7 komponent vaksine (C6-ILA), økte ikke grad av bivirkninger sammenlignet med den kommersielt brukte vaksinen C-6. Sammenvoksninger har her ikke påvirket muskel eller ryggradsvekst.

I to tidligere rapporterte forsøk der det var god vekst og ulik grad av sammenvoksninger fant man korrelasjon mellom sammenvoksninger, vekst, og ryggradsdeformasjoner (Oppedal m.fl. 2005; Berg m.fl. 2006).

I vårt forsøk fant vi ikke sammenheng mellom grad av sammenvoksning og vekt ved slakt på individnivå. En slik sammenheng er rapportert tidligere (Midtlyng & Lillehaug 1998), og kan forklares enten ved at 1: Sammenvoksninger gir redusert vekst, eller ved at 2: Liten fisk i en gruppe ved vaksinerings forblir minst, samtidig som liten fisk er mer utsatt for å utvikle sammenvoksninger (Berg m.fl. 2005)

Forsøket som her er omtalt er utført med høstmolt, som erfaringsmessig har vist seg å ha større risiko for sammenvoksninger og deformasjoner enn vårmolt. Forsøket ble imidlertid startet relativt sent på høsten, uten ekstremt høye temperaturer, og man unngikk vaksinerings av liten fisk. Ut fra temperatur og fiskestørrelse anses forsøket å ligge innenfor normal risikosone for bivirkninger, men høyere enn for vårmolt.

KONKLUSJON

Forsøket viser at det også på høstmolt, under normale forhold, er mulig å benytte multivalent oljebasert vaksiner, uten at det gir uakseptable sammenvoksninger i bukhulen, samt at disse sammenvoksningene ikke nødvendigvis fører til redusert vekst eller til ryggradsdeformasjoner.

Forsøkene er gjennomført av Havforskningsinstituttet som en del av industriprosjektet "Optimal vaksinasjonsstrategi for reduserte bivirkninger" finansiert av Intervet Norbio AS

REFERANSER

- Berg A., Rødseth, O.M., Hansen T. (2006a) Fish size at vaccination influence the development of side-effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Manuskript
- Berg A.E., Rødseth O.M., Tangerås A. Hansen T. (2006b) Time of vaccination influences development of adherences, growth and spinal deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Diseases of Aquatic Organisms 69:239-248.
- Midtlyng, P.J. & Lillehaug, A. (1998). Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. Dis Aquat Org 32:91-97
- Oppedal F, Berg A, Olsen RE, Taranger GL, Hansen T (2005) Photoperiod in seawater influenced seasonal growth and chemical composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. Aquaculture Akseptert.