

C Faglig rapport

1 Oppnådde faglige resultater

FORSØKSOPPSETT

I prosjektperioden er det utført to omfattende vaksinasjonsforsøk med en vaksine med høy bivirkningsprofil. Begge forsøkene ble utført med utgangspunkt i følgende protokoll:

Fisk	Laks, <i>Salmo salar</i>
Størrelse (g)	35-40 g (sortert)
Antall	310 stk
Opphav	Havforskningsinstituttet
Merking	Pit-tags

Forsøksgrupper	Antall fisk	Behandling
A	60	Uvaksinert kontroll
B	60	Sham i.p.fys. saltvann
C	60	i. p. 0.4 ml vaksinert
D	60	i. p. 0.1 ml vaksinert
E	60	DMS 0.1 ml vaksinert
E	10	0-prøve før vaksinerings

Miljøbetingelser	
Salinitet (‰)	0
Temperatur (°C),	14 °C
Fôring (kommersielt tørr fôr)	Standard

Kar nr	1	2	3
Ant., gruppe	20A+20B+20C+20D+20E	20A+20B+20C+20D+20E	20A+20B+20C+20D+20E

Fisken ble bedøvd med benzocain, og vaksine ble injisert intraperitonealt eller i dorsal midian sinus (DMS). Sham injisert fisk fikk samme mengde sterilt fysiologisk saltvann.

Ved oppstart ble all fisk veid og lengdemålt, og data ble registrert i forhold til individ. 10 stk 0-prøver ble tatt ut før vaksinasjon og fiksert for å kunne kvalitetssikre. Ved sluttuttak ble alle individer veid, lengdemålt og røntgenfotografert. Speilbergs-score ble også registrert på all fisk. Prøver ble fiksert til histologi/stereologi. Prøver ble også frosset med henblikk på mineralanalyser og testing av virvlernes mekaniske egenskaper. Prøvene ble merket med kar nummer og PIT-tagnummer slik at all materiale kunne bli tilbakeført til individ.

Materiale fra forsøkene er blitt bearbeidet ved hjelp av en rekke metoder med henblikk på å belyse spørsmålene som er nedfelt i prosjektbeskrivelsen.

Sentrale analysemetoder og metodeutvikling

- Diverse lysmikroskopiske metoder
- Utvikling av metoder for rekonstruksjon av store vevsnett
- Etablert nye metoder for skeletering av bein for scanning elektronmikroskopi
- Scanning elektronmikroskopi
- Mikro-computed tomografi
- 3D rekonstruksjon av ryggvirvler
- Kvantitative analyser av beinstrukturer som beinvolum, beinoverflate og konektivitet
- Målinger av virvlers mekaniske egenskaper, f. eks. stivhet, yield load og resilience, ved hjelp av kompresjonanalyser
- Måling av mineralinnhold og mineralrate
- Stereologi med utgangspunkt i tilfeldig, systematisk prøvetaking
- Volumberegninger av mykvev slik som eksokrin, endokrin pankreas, visceralt fett og tarm
- Morfometrisk analyse av cellevolumer i pankreas

I lys av overnevnte, har prosjektet, i høy grad, medført utvikling av nye metoder tilpasset studier av ryggvirvler hos fisk. Denne kompetansen vil komme fremtidige prosjekter til nytte.

RESULTATER

1. Generelle funn knyttet til endringer i tilvekst som følge av bukhinnebetennelse induisert av vaksinasjon

Forsøkene viste at vaksineindusert bukhinnebetennelse hadde en negativ effekt på tilvekst, både målt i lengde og vekt. Forskjellene var statistisk signifikante uavhengig av vaksinedose og vaksinasjonssted. I tillegg til veksthemmingen, var det overraskende at vaksinert fisk endret kroppsproporsjoner ved at de ble trinnere (økt kondisjonsfaktor).

2. Resultater sett i forhold til delmål

Delmål 1. Korttidsvirkning av vaksinasjon på bukholeorganer

Hovedresultater

- Signifikant lavere volum av eksokrin pankreas i forhold til fiskelengde ble påvist hos fisk vaksinert intraperitonealt
- Vevsdød/nekrose ble observert hos fisk med peritonitt
- Samlet sett, tyder dette på at vaksinasjonsindusert peritonitt skader eksisterende eksokrin pankreas. Trolig medfører dette en negativ effekt på utvikling og vekst av organet
- Redusert tilvekst, som følge av vaksinasjonsindusert peritonitt, kan med utgangspunkt i våre resultater forklares som en kombinert effekt av nedsatt

fordøyelse som følge av pankreasskade, og de metabolske kostnader ved immunresponsen

- Økningen av kondisjonsfaktor som forekom parallelt med en økning av visceralt fettvolum, tyder på at vaksineindusert peritonitt påvirker fettmetabolisme og dermed vekststrategi, ved at immunrespons og dannelse av opplagsnæring blir prioritert fremfor lengdevekst
- Endokrin pankreas var uberørt, sannsynligvis som følge en mer skjermet lokaliseringen i forhold til betennelsesprosessen

Delmål 2. Korttidsvirkning av vaksinasjon på skjelettet:

Hovedresultater

- En endring av virvlens proporsjoner i haleregionen ble observert som en følge av inflammasjon. Dette framkom ved at virveldiameteren økte i forhold til virvellengden. Denne endringen reflekterer trolig påvirkning av virvlens vekstsoner. Om dette representerer et tidlig utviklingsstadium av misdannelsen platyspondyli krever lignende eksperimenter med et lengre tidsperspektiv
- Mikro-CT analyser viste en tendens mot at virvler fra vaksinert fisk hadde en lavere beinoverflate, til tross for uendret beinvolum
- Målinger av virvlens mekaniske egenskaper og mineralinnhold viste ingen signifikante forskjeller mellom gruppene
- Prosjektet har vist at mikro-CT er et velegnet verktøy for å analysere kvantitative og kvalitative osteologiske påvirkninger av ryggvirvler i eksperimentelle studier. Metoden muliggjør evalueringer av hvordan forsøksparametere påvirker virvlens utvikling ved hjelp av en rekke parametre

Årsak til sykdommen er en bakterie som kalles *Aeromonas salmonicida*. Denne bakterien er vanlig i oppdrett av laks og kan overføres mellom fisker.



POPULÆRVITENSKAPELIG FRAMSTILLING

Laks i oppdrett blir, før utsetting i sjø, rutinemessig vaksinert ved injeksjon i bukhuften. Vaksinen forårsaker en varierende grad av bukhinnebetennelse, som kan medføre

sammenvoksnings mellom bukholeorganer. Det er usikkert i hvilken grad betennelsesreaksjonen påvirker/skader disse organene. Noen observasjoner tyder på at vaksinebivirkninger i bukholen kan ha en negativ påvirkning av ryggraden, noe man antar kan forårsake utvikling av korthaler, som har flatklemte og kortere ryggvirvler enn normalt (platyspondyli). Prosjektets formål var å studere korttidseffekter av vaksinasjon på utvalgte bukholeorganer og ryggrad i forsøk av tre måneders varighet. Det ble anvendt en spesialutviklet vaksine, formulert slik at den ville forårsake høy grad av bukhinnebetennelse. Ulike doser ble injisert.

Forsøkene viste at vaksineindusert bukhinnebetennelse hadde en negativ effekt på tilvekst både målt i lengde og vekt. Til tross for denne veksthemmingen var det overraskende at vaksinert fisk endret kroppsproporsjoner ved at de ble trinnere (økt kondisjonsfaktor). I vaksinert fisk var dessuten volumet av bukspyttkjertelen (pankreas) lavere som en følge av at det vevet som skiller ut fordøyelsesenzymmer (eksokrin pankreas) ble skadet og/eller fikk hemmet vekst. Den reduserte tilveksten i de vaksinerte gruppene kan derfor skyldes en kombinasjon av nedsatt fordøyelse som følge av skader i bukspyttkjertelen, sammen med stoffskiftekostnader knyttet til betennelsesreaksjonen. Til tross for veksthemmingen, er det interessant at volumet av fett omkring bukholeorganene (visceralt fett) i de vaksinerte gruppene økte. Denne akkumuleringen av fett kan ha bidratt til den observerte økningen i kondisjonsfaktor. Med andre ord, kan immunrespons, som følge av vaksinasjon, føre til at dannelse av opplagsnæring, i form av fett, blir prioritert fremfor lengdevekst av fisken. Til sammen viser disse resultatene at vaksinerings påvirker både tilvekst (vekt, lengde), vekstmønster (økning i kondisjonsfaktor) og stoffskifte (økning av fettmengde).

Effekter av vaksinasjon på ryggvirvlernes utvikling og vekst ble undersøkt ved hjelp av en rekke metoder, deriblant røntgen mikrocomputertomografi (micro-CT). I løpet av den korte tiden forsøket varte, ble det observert en endring av virvlene i haleregionen, hvor de viste en økning i diameter, og dermed unormale proporsjoner. Det var også en tendens til at vaksinasjon medførte en reduksjon i virvlernes beinoverflate. Begge disse observasjonene kan være knyttet til påvirkning av de vekstsoner hvor beinvevet dannes. Hvorvidt det endrede vekstmønsteret kan tenkes å påvirke virvlernes mekaniske egenskaper, så som styrke, over lengre tid, gjenstår å undersøke. Som tidligere nevnt ser det ut som om det kun er virvler i haleregionen som er påvirket av en betennelsesreaksjon etter vaksinasjon. Virveldeformitetene i korthaler forekommer i samme region, og våre funn kan dermed muligens avspeile et tidlig utviklingsstadium av denne sykdomstilstanden. Framtidig arbeid bør inkludere forsøk med det formål å belyse langtidseffekter av bukhinnebetennelse både hva gjelder skjelettsystemet og bukholeorganer. Videre er det nødvendig med mer kunnskap om for eksempel den normale utvikling og vekst av organer som pankreas.