

Fisk i forskning – miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk

En utredning av forskningsbehovet

Stort program
HAVBRUK – en næring i vekst



Store programmer

Forskningsrådets satsing på nasjonalt prioriterte områder



Forskningsrådet

Fisk i forskning - miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk

En utredning av forskningsbehovet

© **Norges forskningsråd 2009**

Norges forskningsråd
Postboks 2700 St. Hanshaugen
0131 OSLO
Telefon: 22 03 70 00
Telefaks: 22 03 70 01
bibliotek@forskningsradet.no
www.forskningsradet.no/

Publikasjonen kan bestilles via internett:
www.forskningsradet.no/publikasjoner

eller grønt nummer telefaks: 800 83 001

Grafisk design omslag: Design et cetera AS
Foto/ill. omslagsside: Per Eide, Samfoto (øverste bilde)
NIFES (sebrafisk i kolbe og laksefisk)
Trykk: Allkopi
Opplag: 250

Oslo, desember 2009
ISBN 978-82-12-02726-8 (trykksak)
ISBN 978-82-12-02727-5 (pdf)

Forord

Økt fokus på dyrevelferd både internasjonalt og nasjonalt, fører til økt kunnskapsbehov om miljøkrav og andre forhold av betydning for velferden hos de arter som benyttes i forskning. Som en ledende nasjon innen forskning på fisk er det viktig at Norge bidrar med å fremskaffe kunnskap på dette området.

Norges konsensus-plattform for erstatning, reduksjon og raffinering av dyreforsøk (Norecopa) har i tett dialog med interessepartene (forvaltningen, industrien, academia og dyrevernsbevegelsen) som mål å bidra til økt implementering av "de 3 R'ene" i norsk forskning:

- Replacement
- Reduction
- Refinement

I forståelse med Fiskeri- og kystdepartementet ba Norges forskningsråd Norecopa om å utrede forskningsbehovet innen dyrevelferd hos fisk i forsøk. Våren 2009 ble det satt sammen en arbeidsgruppe på 8 medlemmer til å gjennomføre utredningsarbeidet.

Resultatet av arbeidet presenteres i denne rapporten som bl.a. foreslår forskning som kan bidra til å redusere antall forsøksfisk, og til å sikre at det ikke oppstår fare for unødige belastninger, jf. dyrevelferdsloven § 13 annet ledd (i kraft fra 01.01. 2010). Dette betyr konkret angivelse av forskning som vil bidra til at man ved bruk av fisk i forskning følger de 3 R-ene.

Gruppen takkes for vel utført arbeid.

Forskningsrådet tar rapporten med som en del av grunnlaget for det videre arbeidet med planlegging og prioritering av forskning på området.

Oslo, desember 2009
Norges forskningsråd

Gruppens medlemmer

Forsker Dr. Trond Brattelid, NIFES (leder)
Forsker Dr. Elisabet Forsgren, NINA
Forsker Tom Hansen, Havforskningsinstituttet
Forsker Dr. Øyvind Aas-Hansen, Nofima Marin
Professor Dr. Sveinung Fivelstad, Høgskolen i Bergen
Seniorforsker Dr. Grete Bæverfjord, Nofima Marin
Stasjonsveterinær Anne Ramstad, VESO Vikan
Cand Jur. Inger Helen Stenevik (sekretær)

I tillegg til utredningsgruppen har forsker Dr Åsa Maria O. Espmark, Nofima Marin (Sundalsøra) og seniorforsker Dr Bente Ruyter, Nofima Marin (Ås) bidratt til rapporten.

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|-----------|
| 1 SAMMENDRAG | 8 |
| 2 INNLEDNING | 17 |
| 2.1 Mandat..... | 18 |
| 2.2 Gruppens tolkning og avgrensning av mandat | 19 |
| 2.3 Definisjoner | 20 |
| 2.4 Referanser | 21 |
| 3 MILJØKRAV OG UTFORMING AV FORSØKSOPPSETT | 22 |
| 3.1 Forsøksdyrenes miljøkrav | 22 |
| 3.2 Temperatur | 23 |
| 3.3 Vannbehov og miljøforhold for fisk i forsøk..... | 24 |
| 3.4 Forsøk med fisk i resirkuleringssystemer (RAS)..... | 28 |
| 3.5 Miljøberikelse..... | 29 |
| 3.6 Harmonisering av karmiljø..... | 30 |
| 3.7 Skalering av forsøksenheter | 31 |
| 3.8 Gruppestørrelser og sosialt miljø..... | 33 |
| 3.9 Sebrafisk – en liten fisk med et stort potensial | 34 |
| 3.10 Forskningsbehov | 35 |
| 3.10.1 Temperatur..... | 35 |
| 3.10.2 Vannbehov og miljøforhold for fisk i forsøk | 36 |
| 3.10.3 Forsøk med fisk i resirkuleringssystemer (RAS)..... | 36 |
| 3.10.4 Miljøberikelse | 36 |
| 3.10.5 Harmonisering av karmiljø | 36 |
| 3.10.6 Skalering av forsøksenheter | 37 |
| 3.10.7 Gruppestørrelser og sosialt miljø | 37 |
| 3.10.8 Sebrafisk | 37 |
| 3.11 Referanser | 37 |
| 4 VELFERDSINDIKATORER | 39 |
| 4.1 Kriterier for valg og validering av velferdsindikatorer | 40 |
| 4.2 Klassifisering av velferdsindikatorer hos fisk | 41 |
| 4.2.1 Faktorer som kan påvirke forsøksfiskenes velferd | 42 |
| 4.3 Positive og negative velferdsindikatorer på individ og gruppenivå i forsøk | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Velferd og produksjonsegenskaper | 44 |
| 4.4.1 Tilvekst, vekstrate..... | 44 |
| 4.4.2 Kontroll med syk og død fisk | 45 |
| 4.4.3 Helsestatus | 46 |
| 4.5 Atferd som velferdsindikator | 46 |
| 4.5.1 Svømmeatferd | 47 |
| 4.5.2 Aggresjon og sosiale interaksjoner | 47 |
| 4.5.3 Appetitt | 47 |
| 4.6 Morfologiske velferdsindikatorer | 48 |
| 4.6.1 Kroppsform, kondisjonsfaktor | 48 |
| 4.6.2 Morfometriske studier av kroppsform | 49 |
| 4.6.3 Misdannelser og deformiteter, asymmetri | 49 |
| 4.6.4 Finneslitasje..... | 50 |
| 4.6.5 Katarakt | 50 |
| 4.6.6 Bedømmelse av hud, slimlag og skjellkledning | 50 |
| 4.6.7 Andre morfologiske velferdsindikatorer | 51 |
| 4.7 Indre (fysiologiske) velferdsindikatorer for fisk i forsøk | 51 |
| 4.8 Molekylære og biokjemiske markører | 52 |
| 4.8.1 Neuroendokrine og immunologiske markører | 52 |
| 4.8.2 Integreerte kroppsfunksjoner og telemetri..... | 52 |
| 4.9 Forskningsbehov | 53 |
| 4.9.1 Generelle forskningsbehov..... | 53 |
| 4.9.2 Produksjonsegenskaper og helsestatus | 53 |
| 4.9.3 Atferd som velferdsindikator..... | 53 |
| 4.9.4 Ytre velferdsindikatorer..... | 53 |
| 4.9.5 Indre velferdsindikatorer..... | 54 |
| 4.10 Referanser | 54 |
| | |
| 5 SMERTE, STRESS OG SMERTEVOLDENDE PROSEDYRER OG DYREVELFERDSMESSIGE ENDEPUNKTER HOS FISK | 56 |
| 5.1 Smertereaksjon hos fisk | 56 |
| 5.1.1 Prosedyrer og rutiner forbundet med smerte..... | 57 |
| 5.2 Stressrespons hos fisk | 58 |
| 5.2.1 Akutt stress..... | 59 |
| 5.2.2 Kronisk stress..... | 60 |
| 5.2.3 Prosedyrer og rutiner forbundet med stress..... | 60 |
| 5.3 Stress i eksperimentelle forsøk | 60 |
| 5.3.1 Håndtering | 62 |
| 5.3.2 Merking | 62 |
| 5.3.3 Ernæring | 62 |
| 5.3.4 Toksikologi | 63 |
| 5.3.5 Implantater | 64 |
| 5.3.6 Blodprøvetaking | 65 |
| 5.3.7 Anestesi | 65 |
| 5.3.8 Avliving | 67 |
| 5.4 Dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkt | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4.1 Forsøksoppsettet – indikative endepunkt..... | 70 |
| 5.5 Forskningsbehov..... | 72 |
| 5.5.1 Smertereaksjon hos fisk | 72 |
| 5.5.2 Generell stressrespons | 72 |
| 5.5.3 Eksperimentelt stress | 72 |
| 5.5.4 Dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt..... | 73 |
| 5.6 Referanser | 73 |
| 6 SMERTELINDRING AV FISK..... | 75 |
| 6.1 Smertebehandling på individ eller gruppenivå | 75 |
| 6.2 Forskningsbehov..... | 76 |
| 7 VAKSINEUTVIKLING OG FISKEVELFERD | 77 |
| 7.1 Vaksiner og vaksinasjonsmetoder | 77 |
| 7.2 Myndighetskrav ved utvikling av en vaksine..... | 78 |
| 7.3 Velferdsmessige aspekter knyttet til vaksiner og vaksineutvikling..... | 80 |
| 7.4 Bivirkninger av vaksinasjon | 80 |
| 7.4.1 Vaksinasjon, immunreaksjoner og sammenvoksninger i bukhulen | 80 |
| 7.4.2 Melanindeponering | 82 |
| 7.4.3 Påvirkning av vekst | 82 |
| 7.5 Vaksinasjon og virveldeformasjoner | 83 |
| 7.6 Faktorer som kan påvirke utvikling av bivirkninger | 84 |
| 7.6.1 Temperatur..... | 84 |
| 7.6.2 Fiskestørrelse..... | 84 |
| 7.6.3 Andre biologiske og miljømessige faktorer | 85 |
| 7.6.4 Viktige momenter for å øke velferden i vaksineforsøk | 85 |
| 7.7 Konklusjon..... | 85 |
| 7.8 Forskningsbehov..... | 86 |
| 7.9 Referanser | 86 |
| 8 IMPLEMENTERING AV DE 3 R-ENE I FORSKNING PÅ FISK | 89 |
| 8.1 "Reduction" av fisk i forsøk | 90 |
| 8.2 "Replacement" av fisk i forsøk..... | 91 |
| 8.2.1 Cellekultur | 92 |
| 8.3 "Refinement" av fisk i forsøk..... | 93 |
| 9 KONKLUSJONER OG ANBEFALINGER..... | 94 |
| 9.1 Miljø..... | 94 |

| | |
|--|------------|
| 9.2 Velferdsindikatorer..... | 94 |
| 9.3 Smerte..... | 95 |
| 9.4 Smertelindring..... | 95 |
| 9.5 Vaksineforskning..... | 96 |
| 9.6 Andre områder av betydning..... | 96 |
| 9.6.1 Felles database over miljøparametere på gjennomførte fiskeforsøk | 96 |
| 9.6.2 Formidling til og utdanning av forskere..... | 97 |
| | |
| 10 KOSTNADSOVERSLAG | 98 |
| 10.1 Prioriteringer | 98 |
| 10.1.1 Miljøkrav..... | 98 |
| 10.1.2 Sebrafisk | 99 |
| 10.1.3 Velferdsindikatorer og stress..... | 99 |
| 10.1.4 Smerte og smertelindring..... | 99 |
| 10.1.5 Vaksineutvikling og fiskevelferd | 99 |
| 10.1.6 Formidling..... | 100 |
| | |
| 11 TILGJENGELIGE RAPPORTER AV VIKTIGHET VED FORSKNING PÅ FISK..... | 101 |
| 11.1 VKM rapporter..... | 101 |
| 11.2 EFSA rapporter | 101 |
| 11.3 Andre rapporter, bøker og artikler..... | 102 |
| | |
| KONTAKTLISTE | 104 |

1 Sammendrag

Fisk dekker et stort forskningsområde innen anvendt-, biomedisinsk- og basalforskning, og fisk er derfor en stor og viktig gruppe forsøksdyr i norsk forskning. Samtidig er det betydelige dyrevelferdsmessige utfordringer for å sikre forsvarlig velferd for forsøksdyrene etter dyrevernsloven og forskrift om forsøk med dyr. Dyrevernsloven erstattes av dyrevelferdsloven den 1. januar 2010, og prinsipper i denne loven er derfor lagt til grunn i rapporten. Rapporten bygger også på "Forskningsetiske retningslinjer for naturvitenskap og teknologi" utarbeidet av "Den nasjonale forskningsetiske komité for naturvitenskap og teknologi" som stiller krav til beskyttelse av dyr i forskning.

Mandatet for rapporten er å angi forskningsbehovet og gi råd om viktige prioriteringer knyttet til følgende tema:

- Miljøkrav til ulike fiskearter.
- Velferdsindikatorer hos fisk.
- Smertevoldende prosedyrer og humane endepunkter hos fisk.
- Smertelindring hos fisk.
- Utprøving og validering av fiskevaksiner.

På bakgrunn av disse temaene angir rapporten konkret forskning, som vil bidra til å redusere antall forsøksfisk, samt bidra til å sikre at der ikke oppstår fare for unødige belastninger, jf. dyrevelferdsloven § 13 annet ledd, ved implementering av de 3 R'ene; reduction, replacement og refinement. Prioriteringene gitt i utredningen skal være et verktøy for Forskningsrådet, næring og søkere av forskningsmidler innen fiskevelferd i forskning.

I rapporten er laboratorieforsøk prioritert, og forsøk under kommersielle forhold er ikke vurdert. Vedrørende miljøkrav er hovedvekten lagt på vannmiljø-/kvalitet. Imidlertid inngår fiskens sosiale miljø under behandlingen av velferdsindikatorer.

Miljøkrav

Miljø er i fiskeforsøk et omfattende begrep som i tillegg til vannkvalitet også utgjør blant annet temperatur, ernæring, karforhold og røyking. I og med at fiskens miljøkrav varierer fra art til art og gjennom livssyklus er det et stort behov for harmonisering av miljøet forsøksfisken eksponeres for. Rapporten angir behov for økt kunnskap om fiskens miljøkrav for å optimalisere forsøksbetingelsene fisken eksponeres for.

Temperaturen er en viktig miljøfaktor i fiskeforsøk siden fisk er et vekselvarmt dyr og flere miljøparametere er temperaturavhengige. Det er kjent at ugunstige temperaturer under eggstadiet og tidlige larvestadium fører til deformiteter i fiskens skjelett. I tillegg til at temperaturen påvirker fiskens metabolisme endrer også temperaturen vannets egenskaper, spesielt med hensyn til innhold av løst oksygen.

Vannkvaliteten, vil blant annet med hensyn til oksygenkonsentrasjonen også være avhengige av vanngjennomstrømning. Differansen d i oksygeninnhold mellom innløp og avløp blir sett på som et viktig mål for belastning av vannkvaliteten. Dersom en har lik d -verdi i replikatene i et forsøk så vil disse ha en tilnærmet lik oksygen-konsentrasjon i avløpet, samt tilnærmet lik konsentrasjon av karbondioksid og pH-verdi i avløpet. D -verdien er derfor en godt egnet miljøparameter for overvåking av vannmiljøet og kan bidra til bedre standardisering av forsøksbetingelser mellom forsøksgrupper. Når en har svært like replikater så kan en muligens unngå å bruke mer en to replikater i forsøkene og dermed reduserer antall fisk i forsøket.

Med forventninger om en fremtidig begrensning i vanntilgangen vil resirkuleringsystemer (RAS) etter hvert introduseres i fiskeforsøksenheter. RAS og fjerning av aluminium, som er toksisk ved økte CO_2 konsentrasjoner, krever god kunnskap om hvordan vannparametere påvirkes av rensing og behandling av vannet. Variabelt vannmiljø kan også være en betydelig feilkilde for forskningen.

De ulike fiskeartene som benyttes i forsøk stiller ulike krav til utforming av kar, hastighet på vannstrøm og individtetthet. Biomatter i klekkerier for laksefisk og sand på karbunnen ved hold av flatfisk er eksempler på miljøberikelse med utgangspunkt i fiskeoppdrett. Det er imidlertid lite dokumentert forskning på hvorvidt ulike tiltak for miljøberikelse i forsøk har en effekt på fiskens velferd. Avhengig av forsøkets art vil standardisering av karmiljø bidra til å redusere variasjon mellom forsøksgrupper.

Forskningsbehovet innen harmonisering av miljøet for de ulike fiskeartene som benyttes i norsk forskning i dag er betydelig. Det bør fokuseres på effekten av temperatur på fiskens biologi og vannmiljø, gruppestørrelser, skalering av forsøksenheter og de ulike arters vannbehov både i gjennomstrømningssystemer og i RAS-systemer der d -verdien er viktig. Videre er det ønskelig å etablere kriterier for overvåking av miljøet og standardisering av vannmiljøet i forsøksenhetene for å begrense variasjonen i forsøksgruppene imellom. Den største kunnskapen om kareffekter finnes lokalt, og det er derfor behov for systematisk dokumentering og evaluering for etablering av felles karmiljøstandarder.

Etter 30 år som modellfisk i laboratorier verden over er standardiserte miljøparametere godt etablert for sebrafisk. Bruken av sebrafisk er økende i Norge, spesielt innen utviklingsbiologisk og biomedisinsk forskning. De standardiserte miljøparameterene og den begrensede plassen sebrafisk krever er det mulig å redusere bruken av fisk i forskning ved å etablere komparative forsøksmodeller som er overførbare fra sebrafisk til de andre fiskeartene som benyttes i forskning i dag.

Velferdsindikatorer

Velferdsindikator er en målbar indre (på eller i fisken) eller ytre (fiskens fysiske eller sosiale miljø) parameter som er knyttet til variasjon i fiskens velferdsstatus.

En inndeling for velferdsindikatorer hos fisk er:

- Fysiologiske indikatorer
- Atferdsindikatorer
- Morfologiske indikatorer
- Fysisk helse
- Indirekte velferdsindikatorer (tilsvarende miljøkrav i denne rapporten)

Velferdsindikatorer kan også klassifiseres på bakgrunn av hvorvidt de tillater kontinuerlig eller punktvis måling, i forhold til grad av mulig påvirkning på forsøksfiskene, og hvorvidt de måles på individ- eller gruppenivå.

Rapporten angir flere generelle forskningsbehov, bl.a. behov for grunnleggende kunnskap om variasjon i og validering av de mest brukte velferdsindikatorer, parametere for velferdsscore, kunnskapsdatabase for normalverdier og individuell variasjon, samt identifisere og validere indirekte velferdsindikatorer.

Andre forskningsbehov er kriterier for humane / dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkter, grenseverdier for god og dårlig velferd ved å relatere atferd med fysiologi og morfologi, definere gode atferdsindikatorer for velferd, systematisere og videreutvikle kunnskap om ytre velferdsindikatorer, økt dokumentasjon på og videreutvikling av teknologien for telemetriske velferdsindikatorer og måling av indre parametre i fiskens ytre miljø (f.eks. måling av kortisolnivåer i utløpsvann), samt validering og videreutvikling av håndholdte målere for nær umiddelbar måling av fysiologiske parametre (f.eks. laktatmålere, glukosemålere).

Smertevoldende prosedyrer og humane endepunkter hos fisk.

Smerte er en ubehaglig sensorisk og emosjonell erfaring assosiert med en faktisk eller potensiell vevsskade, eller en forventning om en slik skade. Stress er en tilstand, som følge av fysisk eller psykisk påvirkning, som karakteriseres av at organismens vitale likevekter (homeostase) utfordres. Fiskens smertereaksjon er noe omdiskutert, men det faglige grunnlaget tilsier at man skal gå ut fra at fisk kan oppleve smerte. Stress kan være en akutt forbigående, eller en kronisk, tilstand. Generelt er responsen på akutt stress relativt godt beskrevet for flere arter fisk og skiller seg i prinsippet lite fra andre vertebrater (inklusive mennesker). Ved kronisk stress er det risiko for bl.a. nedsatt immunforsvar, økt hjerterate, fordøyelsesproblem og kardiovaskulære problem.

I fiskeforsøk kan bl.a. følgende prosedyrer være forbundet med stress og smerteopplevelse; fangst (f.eks. elektrofiske), finneklipping, ulike typer av merking, kirurgiske inngrep, håndtering og bedøving-/avliving. Stress, og i enkelte situasjoner trolig også smerte, kan også utløses av endringer i miljøforhold (f.eks. oksygeninnhold, temperatur, salinitet, trykk mm.). Stressituasjoner man vanligvis ikke forbinder med smerte er f.eks. begrenning av bevegelse (for lite plass), sosialt stress (for mange individer på for lite plass) eller fordi fisken føler seg truet (ingen skjul, trangt, nærvær av predator etc) eller når naturlig atferd er umulig.

Ikke-planlagt smerte eller stress kan i tillegg til å være et velferdsproblem også være en alvorlig feilkilde i forsøket.

Når det gjelder smertereaksjon hos fisk, er viktige forskningsbehov å skaffe til veie grunnleggende fysiologisk og atferdsmessig kunnskap om bevissthet, kognisjon og hjernefunksjon knyttet til mulig smerte og frykt, samt utvikle målbare indikatorer (f.eks. fysiologiske- eller atferdsmessige reaksjoner) for opplevelse av smerte hos fisk.

Når det gjelder stressreaksjon angir rapporten en rekke forskningsbehov, blant annet kvantifisering av kronisk stressrespons (fysiologi og atferd) ut fra art, livsstadie og naturlig individuell variasjon, -noe som igjen forutsetter økt grunnleggende kunnskap om respektive akutte stressresponser.

Når det gjelder fiskens stressreaksjon relatert til forsøk (eksperimentelt stress), angis bl.a. følgende forskningsbehov; etablering av harmoniserte og validerte forsøksbetingelser tilpasset art og utviklingsstadium, prosedyrer for forsvarlig håndtering uten anestesi for ulike arter, effekt av gjentatte prøveuttak, avlivingsmetoder, hvilke anestesimidler som fungerer best på de ulike arter og utviklingsstadier, interaksjon mellom anestesi og ulike forsøksbetingelser, kort og langvarig effekt av anestesi, stress (og smerte) knyttet til merking, merkemethoder og merkeeffekter på kort og lang sikt, identifisere parametere for evaluering av velferd og subletale doser av toksiske substanser, og etablere et referanseoppsett for toksikologisk evaluering på representative fiskearter i norske farvann.

Humant eller dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt refererer til hva som er en menneskelig / dyrevelferdsmessig forsvarlig måte å behandle dyr på, og sier noe om hvor lenge fisken kan utsettes for belastninger i forsøkssammenheng. Endepunktet viser til en tilstand hvor fisken oppfyller et av de avsluttende målene definert i forsøket, eller belastningen på fisken blir for stor. En fisk som når et endepunkt ekskluderes fra forsøket.

Det vil være stor grad av overlapp mellom avsluttende endepunkt og velferdsindikatorer, da endring i et endepunkt ofte vil være basert på en eller flere velferdsindikatorer. Indikatorer for endepunktet kan relatere seg til gruppen, eller individet. Indikatorer som kan tilsi et endepunkt på gruppenivå kan f.eks. være lavt oksygeninnhold i utløpsvann, som markerer høyt oksygenforbruk ofte forbundet med stress. Tilsvarende med nivået av ammoniakk og katekolaminer. Andre eksempler på indikatorer er atferd, som f.eks. gruppens posisjonering i karet og utnyttelsen av vannsøylen, økt gjellelokkbevegelser og utbrudd av infeksjoner. På individnivå observeres fisk som skiller seg ut fra resten av forsøksgruppen eller et representativt utvalg av forsøksgruppen. For eksempel kan avvikende atferd i forhold til resten av forsøksgruppen være et signal på at denne fisken har dårlig velferd. Tilsvarende om enkeltfisk har endret respirasjon (frekvens- eller styrke) sammenlignet med de øvrige.

Med dagens kunnskap og kompetanse skjer det at et endepunkt først observeres når fisken har hatt dårlig velferd over lengre tid. For eksempel kan det i toksikologiske forsøk hvor fisk eksponeres for miljøgifter gjennom føret, ta relativt lang tid før det observeres endringer i fiskens stressrespons, mens det på et tidligere tidspunkt kan observeres endringer i organer. Det er derfor viktig å utvikle kunnskap, og etablere gode overvåkningsrutiner med endepunkt

som har mulighet til å fange opp effekter av forsøksbetingelsene på fisken på et tidligst mulig tidspunkt.

Rapporten angir bl.a. følgende forskningsbehov relatert til forsvarlige endepunkt; identifisere parametere i vannet som kan brukes som endepunkt, definerte endepunkter for ulike arter, definerte endepunkter for ulike typer forsøk, grenseverdier for ulike endepunkt, krav til pilotstudier for definering av avsluttende endepunkt og forholdet mellom negative velferdsindikatorer og endepunkt.

Smertelindring hos fisk

For å begrense belastningene forsøksfisk utsettes for ved utstrakt håndtering, kirurgiske prosedyrer eller manipuleringer bedøves fisken. Det er en forutsetning at belastningene ved bedøvelsen i seg selv ikke overstiger belastningene ved den eksperimentelle prosedyren.

Det ideelle bedøvelsesmiddel for fisk skal bl.a. gi tap av bevissthet og opphør av mulig smertepersepsjon, og ikke påføre fisken vesentlig ubehag eller stress. Kravet til bedøvelsesmiddel knyttet til medisinsk og kirurgisk behandling er regulert i dyrevelferdsloven § 9, tredje ledd: "Ved smertefulle inngrep skal det nyttes nødvendig bedøvelse og smertelindring."

Ved inhalasjonsanestesi er gjellene i nær tilknytning til sentralnervesystemet (CNS) hos fisk, hvilket gir en rask og effektiv bedøvelse i vann. Injeksjonsanestesi er generelt en mer belastende metodikk.

Hvilken fiskeart man skal anestesere er av stor betydning siden ulike arter kan reagere forskjellig på anestesimidlene. I tillegg kan temperatur, stress, livsstadie, årstid og tid på døgnet og andre faktorer ha betydning.

I dyreforsøk forbundet med smerte skal smertelindring (analgesi) benyttes for å begrense belastningene dyret utsettes for (inkludert fisk). Analgesi virker smertelindrende ved å blokkere reseptorer i nervesystemet forbundet med nocisepsjon og tolkning av nociseptoriske signaler.

Forskningsbehovet innenfor smertelindring er bl.a. å finne gode medikamenter som gir smertefrihet (analgesi) og som ikke utsetter fisken for vesentlige belastninger, karakterisere hva som kan være, og som ikke er, smertefullt for ulike fiskearter, samt metoder for skånsom og effektiv smertelindring, herunder effekt av smertelindring og doseringer for ulike fiskearter-/individer.

Vaksineutvikling og fiskevelferd

I sin enkleste form er vaksiner basert på drepte eller svekkede mikroorganismer, som skal få til en immunologisk respons. Vaksinasjon kan gi bivirkninger som i hovedsak er

immunreaksjoner/betennelser, sammenvoksninger, melanindeponering og effekter på vekst og skjelettdeformasjoner.

Bruket av forsøksdyr i forbindelse med utviklingen av vaksinene utgjør mesteparten av de nesten 3,4 millioner fisk som ble registrert som forsøksdyr i 2007. Vaksineutvikling har derfor betydning for et stort antall forsøksfisk, og for et svært mange fisk i oppdrett. Vaksiner i oppdrett er likevel nødvendig for å unngå sykdom og dødelighet. Fravær av vaksinasjon ville raskt ført til sykdomsproblemer med uakseptable konsekvenser for dyrevelferd og miljø. Samtidig er omfanget av bivirkninger et alvorlig dyrevelferdsmessig problem, og i denne sammenheng er det sentralt at fisken ofte kan leve lenge, gjerne frem til slaktetidspunkt, med kroniske belastninger.

Årlig vaksineres om lag 270 mill laks og ørret. Hoveddelen blir stikkvaksinert i buken med oljebaserte vaksiner. Det brukes både manuell vaksineringsmaskiner med håndsprøyte og vaksineringsmaskiner. Kvaliteten på arbeidet under selve vaksineringsprosedyren kan ha mye å si for resultatet både med hensyn til beskyttelse og bivirkninger. Eksempelvis er stikkpunkt, nål, kalibrering av utstyr, sortering, hygiene, bedøvelse og sulting mv., viktig for å unngå feilstikk eller manglende vaksineringsprosedyre. Feilstikk i filet eller inn i organ/blindsekker, dårlig hygiene, opprisset sårkant mv., kan være med å øke grad av bivirkninger.

Det er skrevet omfattende veiledninger for vaksineringsprosedyre, vaksinasjonskontroll og oppfølging. Det er mange enkeltfaktorer som kan justeres, harmoniseres og kontrolleres. Mye praktisk erfaring er samlet og ligger til grunn for anbefalingene. Det er imidlertid lite publisert materiale om effekt og viktighet av ulike rutiner og vaksinasjonsprosedyrer. Utfordringene blir å bruke kunnskap om de ulike vaksiner, temperatureffekt, fiskestørrelse, vaksinasjonsteknikk etc., til å redusere risiko for avvikende bivirkninger.

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.

Forskningsbehov innenfor vaksineutvikling er bl.a. videreutvikling av konsepter som DNA-vaksinasjon og rekombinante vaksiner. Eventuelle livssynsmessige eller politisk motiverte føringer mot bruk av slik teknologi må vektles mot dyrevelferdsmessige og miljømessige fordeler med bedre vaksineteknologi. Andre forskningsbehov her er utvikling av spesielle forsøksdyrlinjer for laks (f.eks. klonete, innavla eller Specific Pathogen Free (SPF) linjer) som kunne vært brukt innledningsvis i vaksinstudiene. Disse kunne gi mer spesifikke svar og redusere behovet for forsøksdyr i feltstudiene. Til sammenligning finnes det SPF mus som gjør at antallet dyr i forsøk kan reduseres betydelig. Videre må de europeiske farmacopoeia monografene forbedres med tanke på å redusere antallet forsøksdyr. For eksempel er det allment kjent at effekttesten som er beskrevet i furunkulose monografen ikke gir tilfredstillende svar. Den gjennomføres allikevel fordi den er et myndighetskrav, men gjøres i tillegg til andre tester. Offentlig regelverk som krever bruk av flere forsøksdyr enn det reelle behovet, må oppheves. Dette blant annet ut fra en harmonisering med dyrevelferdsloven og forskrift om forsøk med dyr, som begge inneholder forpliktelser etter EØS-avtalen. Tilsvarende er det påtrengende ut fra hensynet til dyrevelferd, at

legemiddelverket krever lavere prosent enn 10 % alvorlige bivirkninger for å godkjenne en vaksine.

Implementering av de 3 R-ene i forskning på fisk

Reduce (redusere) - betyr å oppnå sammenlignbare resultater med færre dyr eller mere informasjon med samme antall dyr. Replace (erstatte) - betyr å unngå bruk av dyr eller erstatte dyr som omfattes av dyrevernsloven (dyrevelferdsloven fra 01.01. 2010) når dyreforsøk ikke er til å unngå. Refine (raffinere) - betyr å unngå eller begrense smerte og belastninger og fremme dyrevelferd til forsøksdyr.

Reduction av fisk i forsøk

Rapporten angir bl.a. følgende tiltak for å redusere antall forsøksdyr; unngå parallelle forsøk ved hjelp av database administrert av Forsøksdyrutvalget, god kontroll med de forsøk det søkes om, bruk av pilotforsøk, etablering av matematiske modeller, bruk av modellfisk som sebrafisk i standardisert miljø under utprøving og tilpasning av nye eksperimentelle modeller før de overføres til andre arter, og oppheve offentlig regulering som krever bruk av flere dyr enn nødvendig.

Replacement av fisk i forsøk

Rapporten angir bl.a. følgende tiltak for å erstatte bruk av forsøksdyr; økt bruk av celler i kultur, organkultur og bruk av livsstadier som ikke omfattes av lovverket.

Refinement av fisk i forsøk

Rapporten angir bl.a. følgende tiltak for å forbedre dyrevelferden i forsøket; mer fokus på positive faktorer, f.eks. hvilke miljøfaktorer bidrar til god velferd, utvikling av mer komplekse atferdsmodeller for å tolke velferdsstaus, etablere nye parametere og målemetoder for å kunne beskrive fiskens velferd og miljøberikelse for økt trivsel.

Kostnader

Kostnadene for gjennomføring av de forskningsbehov som er identifisert i utredningen. vil beløpe seg til rundt 57 mill kroner årlig i en periode over fire år. Forskningsrådet bør imidlertid vurdere om det er mulig å få gjennomført flere av de forskningsbehov identifisert i rapporten i eksisterende eller nye forskningsprogram for å redusere kostnadene.

Oppsummering forskningsbehov

Miljøkrav

- Effekt av temperatur på fiskens biologi og vannmiljø.
- Vannbehov, plassbehov og andre miljøforhold for fisk i forsøk.
- Vannbehandling og forsøk med fisk i resirkuleringsystemer.
- Miljøberikelse.
- Harmonisering/standardisering av karmiljø.
- Skalering av forsøksenheter.
- Gruppestørrelser og sosialt miljø.
- Sebrafisk som modell i akvatisk "translasjonell" forskning.

Velferdsindikatorer

- Etablere, identifisere og validere velferdsindikatorer i forhold til art, kjønn, livsstadie, årstid og miljø med vekt på metoder som ikke interfererer med fisken.
- Etablering av standardiserte metoder som velferdsindikatorer, basert på produksjonsegenskaper og helsestatus.
- Etablere kunnskap om individ og gruppebaserte atferdsmønstre i forhold til art og miljø.
- Etablere metoder for identifisering av ytre velferdsindikatorer basert på fiskens utvikling, misdannelser, kroppsform, finneslitasje, skjelltap og slimlagets status.
- Etablere metoder for identifisering av indre velferdsindikatorer som stresshormoner, telemetriovervåking og måling av stresshormoner i utløpsvann.

Smerte

- Bedre forståelse av fiskens smertereaksjon, mulighet for behandling (analgesi) og evaluering av "gamle" og "nye" anestesimiddel og deres effekt.
- Bedre forståelse av fiskens stressrespons gjennom å etablere forståelse av akutte og kroniske stressresponser i forhold til art, miljø og livsstadie og betydningen av positivt stress i fiskeforsøk.
- Bedre forståelse av betydningen av det eksperimentelt påførte stresset, og etablering av harmoniserte dietter/forsøksfôr, håndteringsrutiner, blodprøvetaking og eksperimentell intervensjon.
- Identifisere parametere i vann, blod og atferd som dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt med hensyn til art, utviklingsstadium og type forsøk, og avklare forhold mellom negative velferdsindikatorer og dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkt.

Smertelindring

- Karakterisere hva som er, og hva som ikke er, smertefullt for ulike fiskearter.
- Metoder for skånsom og effektiv smertelindring.
- Effekt av smertelindring.
- Doseringer for ulike fiskearter-/individer.
- Grunnleggende kunnskap om hvor og hvordan de mest aktuelle smertelindrende midlene virker (mekanismer; bl.a. viktig for valg av rett middel for gitt forsøksdesign).
- Effekt av akutt smertebehandling.
- Effekt av kronisk smertebehandling.
- Er smerteopplevelsen påvirket av temperatur/miljø.

Vaksine

- Etablering av "Specific Pathogen Free" (SPF) fisk til bruk innledningsvis i vaksinstudiene.
- Standardisering - De europeiske pharmacopoeia monografiene må videreutvikles/ forbedres med tanke på å redusere antallet forsøksdyr.
- Utvikling av nye vaksinekonsepter med minimale bivirkninger.

Annet

- Database for registrering av miljøparametere i gjennomførte forsøk.
- Etablere kvalitetssikret undervisningsmateriell innen forsøksdyrlære for fiskeforskere.

2 Innledning

Havbruk og fiskeri utgjør viktige næringer i Norge både når det gjelder sysselsetting og eksportinntekter. Det legges derfor ned en betydelig forskningsinnsats spesielt med hensyn til fiskehelse og grunnforskning på de viktige kommersielle fiskeartene. I molekylærbiologisk grunnforskning anvendes det også i stadig større grad laboratoriefisk, og da spesielt sebrafisk, som modelldyr. Fisk utgjør derfor en betydelig andel av alle forsøksdyr som benyttes i Norge hvert år. Av de 3 461 864 forsøksdyr som ble benyttet i Norge i 2007 utgjorde fisk rundt 98 %. Tilsvarende tall for 2008 er 1 921 952 forsøksdyr og 97 % fisk. Den betydelige reduksjonen i forsøksdyr skyldes at det i 2007 ble benyttet 1 318 328 fisk i et enkelt vaksineforsøk. I tillegg forskes det på fiskeegg og larver som ikke inngår i denne statistikken, da de ikke omfattes av gjeldende dyrevernlov. Havbruk er et av forskningsrådets syv store satsingsområder frem mot 2015 og fisk vil derfor være en stor og viktig gruppe forsøksdyr i Norsk forskning også i fremtiden.

Forsøk med dyr er underlagt dyrevernloven og forskrift om forsøk med dyr som oppfyller EU sitt regelverk. Dyrevernloven omfatter pattedyr, fugler, amfibier, krypdyr, fisk og krepsdyr. Forsøksdyrforskriften gjelder de samme gruppene/artene men krepsdyr er her begrenset til tifotkreps. Ny lov om dyrevelferd, som trer i kraft 01.01. 2010, er i forhold til dyrevernloven utvidet til å omfatte blekksprut og honningbier, og innsnevret fra krepsdyr generelt til tifotkreps. Formålet med denne lovgivningen er blant annet å sikre forsøksdyrene forsvarlig behandling og hindre at de utsettes for fare for unødig smerte og belastning, jfr dyrevelferdsloven § 13 annet ledd. Lovens formål er å fremme god dyrevelferd og respekt for dyr, jf. § 1. Etterlevelse og forvaltning av dyrevernlovgivningen forutsetter imidlertid inngående kunnskap om de krav forsøksdyret har til miljø og hvordan det er mulig å tolke dyrets respons på forsøksbetingelsene. Etter en ca. 400 millioner år lang evolusjonshistorie representerer fisk en kompleks dyregruppe som i dag utgjør rundt 25 000 ulike arter spesialisert på sitt miljø. Miljøkrav og atferd er derfor sterkt artsspesifikt for de ulike fiskeartene man benytter i forskning. Norge er i dag en ledende nasjon innen forskning på fisk, og for å sikre innarbeiding av de 3 R-ene (Reduce, Refine og Replace) forplikter det god kjennskap til miljøkrav og andre forhold av betydning for velferden hos de arter som benyttes i forskning.

I tildelingsbrev til Norges Forskningsråd fra Forsknings og Kunnskapsdepartementet for 2008 er samarbeid med Norecopa nevnt spesifikt under "Forvaltningsrettet forskning – Fiskevelferd":

'Med økende fokus på fiskevelferd er det behov for økt kunnskapsgrunnlag. Samtidig er det et økende behov for kunnskap om fisk som forsøksdyr. For prioritering av forskning på dette området må Forskningsrådet ha en dialog med Norecopa, den Nasjonale plattformen for alternativ til bruk av dyr i forskning. Vi viser for øvrig til Norges Forskningsråds kartlegging av forskningsbehov knyttet til velferd innen havbruk. Fra et forvaltningsståsted er det et særlig behov for indikatorer for velferd i ulike faser av produksjonen.'

På denne bakgrunn identifiserte Norecopa følgende fem områder med store kunnskapsmangler:

1. Forskningsbehovet for å fremme de 3 R'ene i vaksineproduksjon
 - a. Beskrive alle stadiene av vaksineproduksjon og testing for å identifisere områder som kan forbedres
 - b. Evaluere potensialet for bedre utnyttelse av statistiske metoder og bedre forsøksdesign for å redusere antallet dyr
2. Forskningsbehovet på miljøkravene til de ulike artene, samt mulighetene til å øke miljøberikelse og dermed trivsel.
3. Forskningsbehov innenfor velferdsindikatorer, med identifikasjon av områdene hvor nye indikatorer (positive og negative) bør utvikles.
4. Forskningsbehov på smertelindring hos fisk, inkludert en oversikt over anbefalte preparater og doseringer for anestetika og analgetika for de ulike artene.
5. Forskningsbehov for å kunne utarbeide en liste over smertevoldende prosedyrer og mulige humane endepunkter til bruk på fisk

På denne bakgrunn gav forskningsrådet Norecopa i oppdrag å *"fremme forslag på 6-7 personer som skal bidra i utarbeidelsen av utredningen, og komme tilbake med en nærmere presisering av punktene Miljøkrav til ulike fiskearter og Velferdsindikatorer hos fisk."*

2.1 Mandat

Norecopa gis i oppdrag å utarbeide en utredning om forskningsbehov om dyrevelferd hos fisk i forsøk. Utredningen må angi kunnskapsbehovet på kort og lang sikt og gi råd om viktige prioriteringer og strategier knyttet til følgende tema:

Utprøving og validering av fiskevaksiner.

Miljøkrav til ulike fiskearter.

Velferdsindikatorer hos fisk.

Smertelindring hos fisk.

Smertevoldende prosedyrer og humane endepunkter hos fisk.

Punktene Miljøkrav til ulike fiskearter og Velferdsindikatorer hos fisk, må imidlertid presiseres noe nærmere.

I tillegg til artene som brukes i havbruksforskningen bør utredningen også dekke andre viktige forsøksdyrarter som sebrafisk.

Utredningen må gi et overslag over kostnadene ved gjennomføringen av forskningen.

2.2 Gruppens tolkning og avgrensning av mandat

Utredningen "Fisk i forskning – miljøkrav til ulike fiskearter og velferdsindikatorer hos fisk" skal bidra til å identifisere områder med manglende kunnskap innen fiskevelferd i forskning. Prioriteringene gitt i utredningen skal være et verktøy for Forskningsrådet, næring og søkere av forskningsmidler innen fiskevelferd i forskning.

Sett i lys av betydelige forskjeller i fysiologi og atferd mellom fiskeartene som benyttes i Norsk forskning er gruppens mandat omfattende. Den økonomiske rammen utgjør også en betydelig begrensende faktor for denne utredningen. Gruppen har derfor måttet avgrenset mandatet for å kunne gjennomføre arbeidet på en tilfredsstillende måte. Forskning på fisk kan i Norsk sammenheng grovt deles i fire: basalbiologisk, biomedisinsk, økobiologisk og akvakultur. I forskning knyttet til akvakultur, som for eksempel rene fôringsforsøk, hvor forsøkene foregår i tilnærmet kommersiell skala finnes det i dag flere rapporter ol. som belyser oppdrettsfiskens velferds- og miljøkrav. Gruppen har derfor valgt å fokusere på det som oppfattes som rene laboratorieforsøk, hvor forsøksgruppene er mindre og foregår i kontrollerte omgivelser.

Sebrafisk som er en ren modellfisk brukes også i stadig større grad i forskning. I og med at sebrafisk benyttes i stor skala på verdensbasis som forsøksdyr er miljøparametere allerede godt kartlagt i eksisterende litteratur. I kapittel 3 Miljøbetingelser, er det tatt med en oversikt over noe av den litteraturen som omfatter miljøparametere og hold av sebrafisk i forskning.

Alle dyreforsøk skal planlegges og gjennomføres i lys av de 3 R-ene for å bidra til å redusere, raffinere/optimalisere og erstatte bruken av forsøksdyr. Det er imidlertid viktig å være klar over nasjonale retningslinjer og krav knyttet til størrelsen på enkelte typer forsøk, som for eksempel vaksineforsøk. Uansett må forsøksgruppene alltid være av en slik størrelse at de har vitenskapelig verdi og bidrar til kunnskapsbygging.

Kildehenvisning vil begrense seg til en oversikt over relevant litteratur etter hvert kapittel i utredningen. En samlet oversikt over rapporter og utredninger fra offentlige og private organisasjoner og den viktigste litteraturen som dekker deler av mandatet gis i et eget vedlegg.

2.3 Definisjoner

De 3 R-ene - prinsipper for bruk av forsøksdyr:

Reduce - redusere: oppnå sammenlignbare resultater med færre dyr eller mere informasjon med samme antall dyr.

Replace - erstatte: unngå bruk av dyr eller erstatte dyr som omfattes av dyrevernsloven når dyreforsøk ikke er til å unngå.

Refine - raffinere: Unngå eller begrense smerte og andre belastninger og fremme dyrevelferd hos forsøksdyr.

Dyrevelferd: individets subjektive opplevelse av sin mentale og fysiske tilstand som følge av dets forsøk på å mestre sitt miljø, og mulighet til å utrykke sin iboende biologiske natur sett i sammenheng med hvor godt det klarer å mestre miljøet eller omgivelsene.

Dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt: henviser til en tilstand hvor fisken oppfyller et av de avsluttende målene definert i forsøket eller belastningen på fisken blir uforholdsmessig stor. En fisk som når et endepunkt ekskluderes fra forsøket.

Forsøk: bruk av dyr for å vinne eller bekrefte kunnskap, også når dette er et nødvendig ledd i den utdannelsen en institusjon gir. Bruk av dyr i produksjon av reagenser som antigen og antistoff o.l., rutinediagnostikk, kontrollvirksomhet og etablering av transgene stammer, regnes som forsøk. Etter ny dyrevelferdslov § 13 vil dette trolig falle innunder begrepet medisinsk virksomhet.

Forsøksdyr: levende fisk med deres frittlevende forstadier.

Forsøksdyravdeling: lokaler som er godkjent av Forsøksdyrutvalget for bruk til dyreforsøk.

Forsøksdyrutvalget: offentlig oppnevnt utvalg med myndighet til å vurdere, godkjenne og kontrollere forsøk med dyr som omfattes av forskrift om forsøk med dyr.

Humant endepunkt: se dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt.

Miljø: fiskens omgivelser som omfatter de ytre påvirkninger og livsvilkår for den enkelte fisk eller en gruppe av fisk.

Smerte: en ubehaglig sensorisk og emosjonell erfaring assosiert med en faktisk eller potensiell vevsskade, eller en forventning om en slik skade.

Stress: en tilstand, som følge av fysisk eller psykisk påvirkning, som karakteriseres av at organismens vitale likevekter (homeostase) utfordres.

Stressor: Indre eller ytre faktorer som utfordrer organismens vitale likevekter (homeostase) og initierer en såkalt stress respons.

Stressrespons: Et koordinert sett av atferdsmessige og fysiologiske responser tenkt å være kompensatoriske og/eller adaptive for opprettholdelsen av organismens vitale likevekter.

Velferdsindikator: En målbar indre (på eller i fisken) eller ytre (fiskens fysiske eller sosiale miljø) parameter hvis variasjon på forutsigbart vis er knyttet til variasjon i fiskens velferdsstatus.

2.4 Referanser

Dyrevernloven

<http://www.lovdatab.no/all/nl-19741220-073.html>

Forskrift om forsøk med dyr

<http://www.lovdatab.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf-19960115-0023.html>

Dyrevelferdsloven

Ot. prp. Nr. 15 (2008-2009) Om lov om dyrevelferd (ikraft 2010)

www.regjeringen.no

Forsøksdyrutvalgets Årsrapport 2008

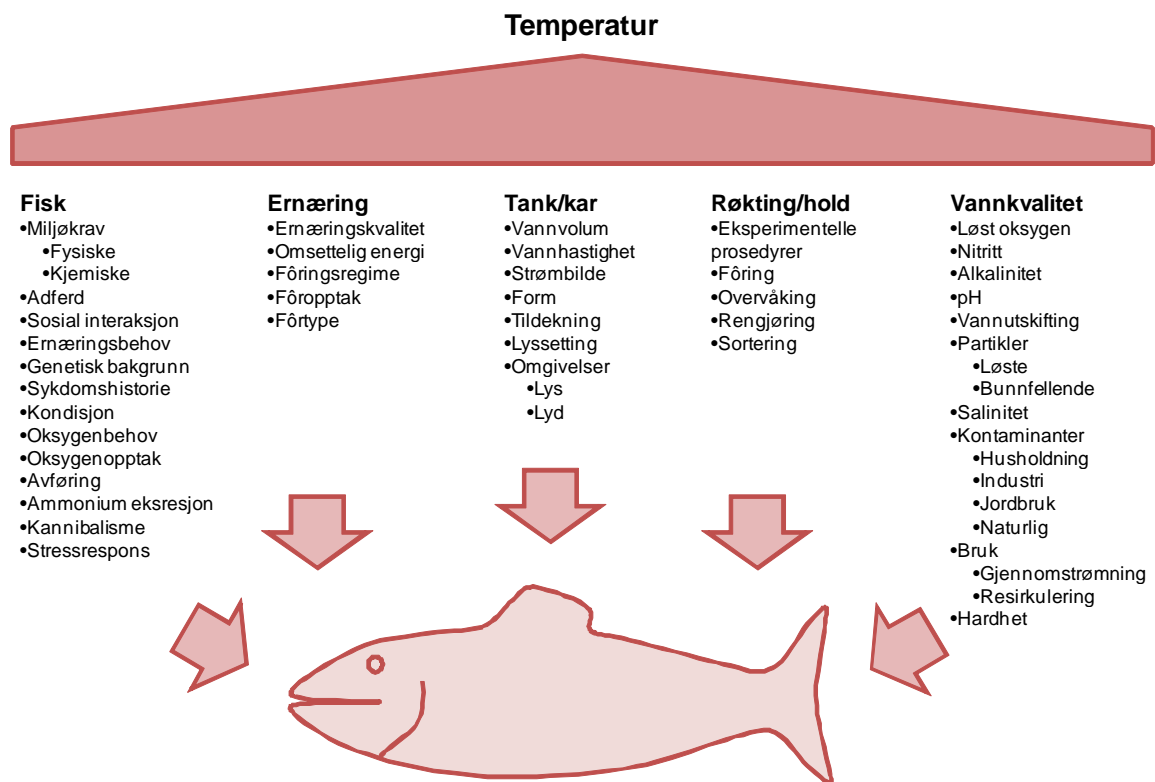
3 Miljøkrav og utforming av forsøksoppsett

Grete Bæverfjord, Sveinung Fivelstad og Tom Hansen

3.1 Forsøksdyrenes miljøkrav

Forsøksdyrenes miljøkrav varierer fra art til art og gjennom livssyklus. I tillegg kompliseres det hele av at det er en betydelig interaksjon mellom miljøparametrene (f.eks temperatur, salinitet og gassmetning). Ervik et al. (2008) har summert opp miljøkravene til torsk, kveite, hummer og laks med tanke på disse dyrene som oppdrettsarter. Denne oversikten har betydelig relevans også for disse som forsøksdyr. En oversikt over miljøparametere av betydning er gitt i Figur 3.1.

Miljø er fiskens omgivelser som omfatter de ytre påvirkninger og livsvilkår for den enkelte fisk eller en gruppe av fisk.



Figur 3.1 Noen av de viktigste miljøbetingelsene som påvirker fisk i forskning er relatert til fisken selv, ernæringsstatus, tank/kar-forhold, den daglige røkting/hold og vannkvalitet, hvor flere er avhengige av temperatur.

For de fleste arter vil f.eks resultatet av et forsøk være avhengig av når på året forsøket gjennomføres. Blant de faktorene som kan påvirke resultatet er bl.a biologiske rytmer, spesifikke prosesser som smoltifisering og kjønnsmodning og miljøparametre som lysperiode og temperatur. I tillegg til de direkte effektene slike parametre har på organismen, så vil de

også virke indirekte bl.a gjennom endringer i fôropptak og vekst. I forskning på vannlevende dyr er det også en spesiell utfordring i at det å styre miljøparametre er dyrt, spesielt i de tilfeller hvor temperaturen skal styres eller hvor en er avhengig av stor vanngjennomstrømming. I forsøk hvor en ikke har tilgang til eller anledning til å bruke miljøkontroll vil en derfor være avhengig av å gjennomføre forsøkene på tider av året hvor en holder seg innenfor miljøkrav etter dyrevelferdsloven § 23.

I det følgende diskuteres noen av de mest sentrale miljøfaktorene med hensyn på forsøksrelaterte problemstillinger. Videre omhandles noen spesielle problemstillinger som gjelder tekniske og driftsmessige problemstillinger knyttet til forsøksdesign og forsøksoppsett.

3.2 Temperatur

Fisk er vekselvarme dyr, og temperatur innvirker på mer eller mindre alle prosesser i kroppen. Det vil si at omgivelsestemperaturen (vanntemperaturen) også vil påvirke resultatet av forsøk med fisk direkte, i langt større grad enn hos varmblodige dyr. De ulike artene har sine temperaturløseområder, som er bestemmende for artenes naturlige leveområder, og temperaturløse for de ulike artene har vært en del av den grunnleggende biologiske kunnskapen i alle år. En del av dette kunnskapsgrunnlaget viser også til ulike temperaturkrav for ulike livsstadier av fisk, men i forhold til villlevende populasjoner er dette i liten grad et tema.

Erkjennelsen av at vi mangler dybdekunnskap om effektene av temperatur er nyere. Når fisk holdes i fangenskap er det mennesker som bestemmer hvilke temperaturforhold fisken skal leve under, og det blir viktig å definere optimale betingelser for de ulike artene og de ulike livsstadier for hver art. Denne erkjennelsen har bl.a. kommet som resultat av erfaringer i oppdrettsnæringa. I siste halvdel av 1990-årene ble det observert en bølge av misdannelser i skjelett og indre organer hos laks i oppdrett, og årsaken ble funnet å være bruk av oppvarmet vann til rogn. Oppfølging av disse studiene har vist at for høye temperaturer også i perioden etter starforing kan indusere misdannelser i ryggvirvlene hos laks. Tilsvarende studier hos regnbueørret har vist at en for denne arten ikke bare har en øvre temperaturløse å forholde seg til på rognstadiet, men også en nedre. Andre erfaringer viser at temperatur under vaksinerings av laks har betydning for graden av bivirkninger. Av mer grunnleggende kunnskap som vokser fram er for eksempel sammenhengen mellom immunfunksjon og temperatur, og økt differensiering av muskelceller hos embryo hos flere arter ved lave temperaturer. I alle eksemplene som er nevnt her gjelder det temperaturer som er godt innenfor artenes toleranseområder, slik de er definert i lærebøkene, men effektene er likevel klare og av en slik natur at de kan ha betydning for kvaliteten av forsøksdata, alt avhengig av forsøksformålet.

Utvikling av moderne molekylærbiologiske metoder gir potensial for økt forståelse av temperatureffektene. De nye metodeverktøyene kan hjelpe oss til å nyansere forståelsen av temperatur og andre faktorer, både i forhold til normal vekst og utvikling hos fisk, og i forbindelse med patologiske prosesser. Ved hjelp av slike metoder vil vi etter hvert få mulighet til å nyansere vår forståelse og å legge fram mer differensierte temperaturanbefalinger, til nytte både for kommersiell produksjon og for fisk som

forsøksdyr. Flere studier har vist at fisken bl.a. har tilsvarende "heat shock" respons som pattedyr og fugl, og "heat shock" proteiner kan brukes som markør for temperaturstress. I arbeid som er under publisering vises det bl.a. avvik i genuttrykk etter temperaturlastning for en rekke gener som er involvert i utvikling av skjelettstrukturer hos laks, også hos fisk uten morfologiske forandringer. Det vil si at fiskens genuttryksprofil potensielt kan brukes til å forutsi noe om fiskens risiko for å utvikle forstyrrelser i skjelettutvikling. Kunnskap på dette nivået er fremdeles i en tidlig utviklingsfase, og fiskevitenskapen har mye å lære av arbeid som gjøres på andre arter. Men samtidig åpner likhetene i biologisk respons på temperatur for at fisk kan være interessant som modelldyr også for forskere som arbeider med andre arter. De fleste fiskearter har et større toleransespenn for temperatur enn varmblodige, og det er lettere å endre kroppstemperaturen hos for eksempel laks med 5 grader, enn tilsvarende hos mus eller kylling.

Temperatur er en viktig faktor for fisken, ikke bare direkte, men også indirekte. Økt temperatur betyr raskere veksthastighet, og med det følger større krav til næringstilgang, oksygentilførsel osv. Det vil si at temperaturrelaterte effekter som observeres kan skyldes direkte effekter på kroppsfunksjoner eller indirekte effekter som følge av endringer i krav til føring, vanntilførsel osv. Temperatur kan også være en forsøksfaktor i seg selv, dvs. at formålet med forsøket er å undersøke effekt av temperatur. I de fleste tilfeller vil temperatur imidlertid være en bakgrunnsfaktor, men det er viktig å erkjenne betydningen av denne faktoren og sørge for at den er under kontroll.

Noen temperatureffekter kan i framtida sannsynligvis testes *in vitro*, dvs. i cellekulturforsøk. Det er gjort pilotforsøk med temperatureffekter på beinceller i kultur som har gitt lovende resultater. Cellekulturforsøk er imidlertid en metode som er under utvikling, og det kreves en økt innsats før vi eventuelt kan erstatte fiskeforsøk med cellekulturforsøk. På kort sikt har slike forsøk likevel et potensiale for å bli et supplement til dyreforsøk, og kan bidra både til å økt dybdekunnskap og til å sikre mer målrettede og presise fiskeforsøk.

3.3 Vannbehov og miljøforhold for fisk i forsøk

I alle forsøk skal en ha en god kvalitet på det nye vannet (behandlet råvann som skal inn til fisken), med mindre dette kommer i konflikt med formålet med forsøket. Det betyr at pH-verdien skal være tilfredsstillende, vannet skal ikke ha forhøyet totalt gasstrykk (nitrogenovermetning) og det skal ikke inneholde konsentrasjoner av toksiske metaller (f.eks. Al eller Fe) eller andre skadelige forbindelser.

Oksygen er ofte den første begrensende faktoren for vanngjennomstrømningen. Dette gjør at en kan tilsette kunstig oksygen til innløpsvannet og dermed redusere vanngjennomstrømningen siden vanntilgangen kan være en begrenset ressurs ved en forskningsstasjon.

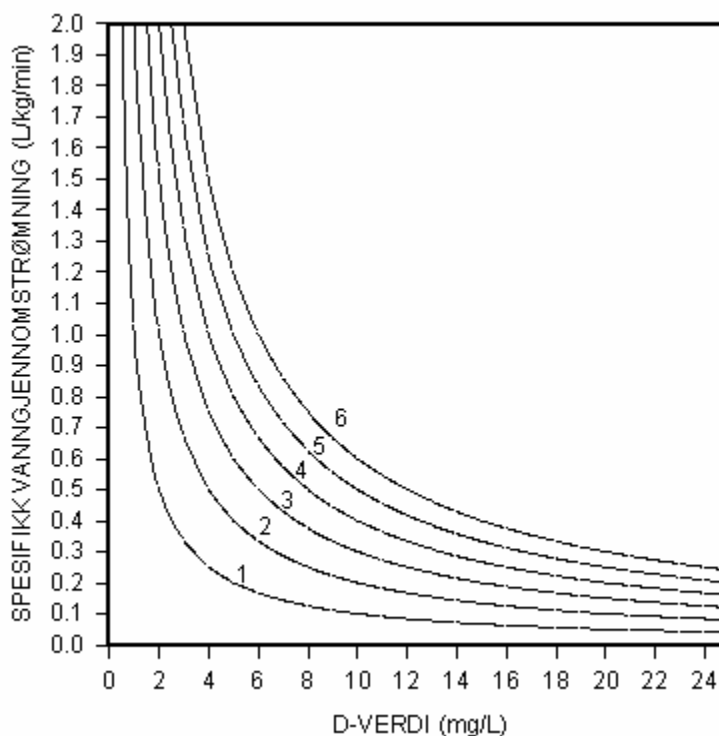
Formelen for spesifikk vanngjennomstrømning (ligning 1) gjelder for alle vannlevende dyr. Differansen d , i oksygenkonsentrasjon mellom innløp og avløp ($DO_{inn}-DO_{ut}$) er et viktig mål for hvor stor akkumuleringen av karbondioksid er og hva pH verdien i vannet blir.

Det spesifikke vannbehovet kan beskrives med følgende formel:

$$(1) \quad q_0 = \frac{M}{DO_{inn} - DO_{ut}}$$

der q_0 er det spesifikke vannbehovet (L/kg/min), M er oksygenforbruket (mg/kg/min) og DO_{inn} and DO_{ut} er henholdsvis oksygenkonsentrasjonen i innløpsvannet (mg/L) og avløpsvannet (mg/L). Denne formelen kan også skrives som:

$$(2) \quad q_0 = \frac{M}{d}$$



Figur 3.2 Sammenhengen mellom spesifikk vanngjennomstrømning og d-verdien (differansen i oksygenkonsentrasjon mellom innløp og avløp (mg/l)). Tallene på figuren angir oksygenforbruket (mg/kg/min). (Copyright Elsevier Science og S. Fivelstad; Fivelstad, 1988).

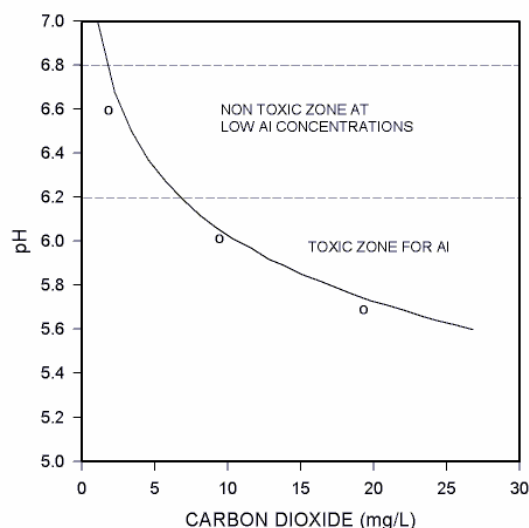
Risikoen for negative effekter på fisken øker med økende d-verdi. Konsentrasjonen av karbondioksid øker proporsjonalt med økende d-verdi, og pH-reduksjonen i vannet øker også med økende d-verdi. Denne differansen (d) uttrykker forholdet mellom oksygenforbruket og det spesifikke vannforbruket (Figur 3.2):

$$(3) \quad d = \frac{M}{q_0}$$

Differansen gir et godt uttrykk for produksjonsintensiteten i et oppdrettsanlegg og i et fiskeforsøk. En kan redusere q_0 når oksygenforbruket minker og dermed bruke en konstant verdi for differansen d . Reduksjonen i vannmengde fører til økning i karbondioksid, reduksjon i pH og økning i total ammonia nitrogen.

Økningen av karbondioksid, total ammonia nitrogen og pH-reduksjonen er proporsjonal med denne differansen. Reduksjonen i pH er ellers avhengig av vannets bufferkapasitet. Det spesifikke vannforbruket vil bare være et godt mål dersom oksygenforbruket er konstant.

Differansen d i oksygeninnhold mellom innløp og avløp blir sett på som et viktig mål for produksjonsintensiteten. I oppdrettsanlegg kan grensen for d -verdien foreløpig settes til 10 (mg/L). I fiskeforsøk må imidlertid d -verdien holdes så lav som mulig for å unngå interaksjonseffekter mellom karbondioksid og andre forsøksparametre. Dersom en har lik d -verdi i replikatene i et forsøk så vil disse ha en tilnærmet lik oksygen-konsentrasjon i avløpet, samt tilnærmet lik konsentrasjon av karbondioksid og pH-verdi i avløpet. Når en har svært like replikater så kan en muligens unngå å bruke mer en to replikater i forsøkene og dermed reduserer en antall fisk i forsøket. Da må en imidlertid ha daglig kontroll av pH og oksygen i avløpet på oppdrettsbassengene. Her er det nødvendig med omfattende forskningsaktivitet for å undersøke om dette er mulig (reducere antall replikater og fisk i forsøk).



Figur 3.3 Vannets pH som funksjon av mengden CO_2 løst i vann (Copyright Elsevier Science and S. Fivelstad; Fivelstad m.fl. 2003).

Aluminium er giftig for fisk og toksisiteten er pH-avhengig med maksimum toksisitet rundt pH 5.0 (Figur 3.3). Når pH verdien blir redusert som følge av akkumulering av CO_2 så forårsaker dette en forandring i prosentfordelingen av uorganiske aluminium (Al)-forbindelser. Når pH-verdien er mellom 6,5 og 6,8 foreligger labilt aluminium som den lite toksiske forbindelsen $\text{Al}(\text{OH})_3$. Når pH-verdien kommer under 6.2 så blir mer og mer av denne formen omdannet til $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ and AlF_2^+ . I fiskeforsøk må en unngå toksiske effekter av aluminium både i kontrollgrupper og forsøksgrupper. Det er derfor nødvendig med videre forskning på komplekseringsmidler for binding av aluminium i forsøk og forskning på målemetoder for aluminium i vann og på gjeller.

Tabell 3.1 Anbefalte vannkvalitetskriterier for klekkerier og smoltanlegg i Norge (FOR, 2004)

| Parameter | Anbefalte konsentrasjoner |
|--|---|
| pH innløp | 6,2 – 6,8 |
| DO metning i kar | Ikke over 100% |
| DO metning i innløp | 90 – 120% |
| DO metning i avløp | > 80% |
| CO ₂ | < 15 mg/L |
| TOC | < 10 mg/L |
| Al, labil fraksjon | < 5 µg/L |
| Al gjeller | < 20 µg/g gjelle før overføring til sjø |
| NO ₂ ⁻ ferskvann | < 0,1 mg/L |
| NO ₂ ⁻ sjøvann | < 0,1 mg/L |
| TAN | < 2 mg/L |

DO: oppløyst oksygen; CO₂: karbon dioksid; TOC: total organisk karbon; Al: aluminium; NO₂⁻: nitritt; TAN: total ammonia nitrogen, i.e. NH₄⁺-N + NH₃-N

Tabell 3.1 sammenfatter viktige grenseverdier for vannkvalitetet i smoltanlegg men verdiene vil ikke være gyldige i fiskeforsøk. For det første så er det ikke pH-verdien i innløpet som er mest interessant, men pH-verdien i karet. Vanligvis finner en sjelden rene pH effekter på laksefisk før pH-verdien kommer under 5.5, men fisken er normalt også utsatt for karbondioksid og i noen tilfeller også Al. Vi kan ha samvirkende effekter av pH; karbondioksid, labilt Al, nitritt (NO₂⁻) og ammonium(NH₄⁺) for lavere verdier enn det som er angitt i tabellen. Det betyr at en må forske på egne vannkvalitetskriterier for fiskeforsøk.

En kan blant annet ikke operere med høge d-verdier og konsentrasjoner av karbondioksid opp mot grenseverdien i et forsøk som omhandler andre parametre enn karbondioksid. Det er viktig med teoretisk tilnærming både på hva miljøforholdene i en kongrollgruppe skal være samt eksperimentelle forsøk. Tabellen over er også satt opp uten henvisning til temperatur, og det er derfor nødvendig med mer kunnskap om hvordan temperaturen virker inn på grenseverdiene. Det er også viktig at forskerne forstår samspillet mellom de forskjellige vannkvalitetsparametrene i et oppdrettsbasseng, og det kan nok erstatte forsøk å studere eksisterende modeller og å utvikle nye modeller for vannkvalitetsparametre (se blant annet Colt og Orvics, 1991).

Ved Høgskolen i Bergen har respirasjonsfrekvensen til fisken i en årrekke vært benyttet til overvåkning av fisk i forsøk, og dette er en svært sensitiv parameter i miljøforsøk. I et forsøk med lav spesifikk vanngjennomstrømning og oksygenering hadde smolten medium forhøyet ventilasjonsfrekvens i 2 måneder og dårlig tilvekst. Andre fysiologiske parametre var lite påvirket. Dødeligheten var liten og fisken vokste deretter godt i sjøvann.

I et annet forsøk der smolten ble eksponert for kombinerte effekter av aluminium, karbondioksid og moderat lav pH (pH 5.7) hadde fisken svært forhøyet pustefrekvens etter to dager og "hostet" mye. I dette tilfellet var det fysiologiske forandringer i alle målte parametre men høy dødelighet startet først etter to uker. Ventilasjonsfrekvensen og hostingen var helt klart den beste og lettest tilgjengelige informasjonen om hvordan fisken

hadde det. Disse rapportene (Fivelstad og Binde, 1994; Fivelstad m.fl. 2003) er viktige å studere for de som arbeider med velferdsindikatorer for fisk.

Videre forskning er nødvendig for å forenkle målemetodene for respirasjonsfrekvensen til fisk i forsøk. Hvordan en starter opp forsøk er også viktig, for eksempel vedakutt eksponering eller gradvis tilvenning til de eksperimentelle betingelser.

3.4 Forsøk med fisk i resirkuleringssystemer (RAS)

Bruk av resirkuleringssystemer (RAS, recirculating aquaculture systems) i oppdrett av kaldtvannsarter er aktualisert de siste årene etter en periode på flere tiår der slike systemer har vært helt uaktuelle i kommersielt oppdrett. Internasjonalt har RAS imidlertid vært i bruk i alle år, både i ferskvatn og i saltvatn. Hovedbruken har vært hos mer varmekjære arter, men spesielt i Danmark har RAS vært brukt til regnbueørret. Bruk av resirkulering til de norske artene er aktualisert av ulike grunner. I lakseproduksjonen er interessen størst når det gjelder produksjon av smolt, dvs. liten fisk i ferskvann, fordi det forventes at tilgang på nok vatn blir en begrensende faktor i årene framover. Samtidig har velfungerende resirkuleringssystemer potensiale til å gi fisken mer stabile forhold enn gjennomstrømningssystemer der kapasiteten presses. Denne forventningen om mer stabile miljøforhold med styrt vannkvalitet er hovedbegrunnelsen for å introdusere RAS i produksjonen av marin fisk, spesielt i yngelproduksjon.

Det er forskningsmessige utfordringer ved introduksjon av resirkuleringssystemer i norsk akvakultur. De anleggene som er i drift er tilpasset andre produksjoner enn de norske, og det finnes lite relevant kompetanse som er uavhengig av leverandørene av slike systemer. Flere norske forskningsmiljøer har tatt tak i denne utfordringen. Sintef Sealab har bygd opp et småskala-anlegg for utvikling av RAS-teknologi til marin yngel i Trondheim, og Nofima Marin bygger et forskningsanlegg på Sunndalsøra som startes opp i 2009. Dette anlegget har forsøksenheter i ulike størrelser, fra små kar til kar i semi-kommersiell størrelse. Norges Forskningsråd har bevilget midler til kompetanseoppbygging i forbindelse med det nye anlegget til Nofima Marin. Det forventes at flere slike forsøksavdelinger vil komme i årene framover. De uttalte målsettingene er at introduksjon av RAS-systemer i Norge skal støtte seg på forskningsbasert kunnskap som er utviklet under forhold som er relevante for norsk næring.

Med tanke på framtidig forskningsbehov er det naturlig å se dette i to faser:

1. Utvikling av RAS-systemer vil medføre behov for forsøk som omhandler fiskens krav i slike systemer
2. Bruk av RAS-systemer gir nye muligheter for å gjøre fiskeforsøk i styrt miljø

Hovedutfordringene under punkt 1 vil være forskning med tanke på å definere miljøkrav for fisk i RAS-systemer. Det er viktig å kartlegge om det finnes særegne grenseverdier for ulike parametre i RAS, eller om miljøkravene er de samme som i gjennomstrømningssystemer. Dette gjelder først og fremst vannkvaliteten, men også spesielle forhold knyttet til utføringsstrategier, vannstrøm, lysforhold, tetthet, temperaturer, mikrobiologiske forhold osv. For de fleste av disse forsøkene vil det dreie seg om utprøving av teknologi og systemer der en forventer et godt miljø for fisken, men det vil også bli nødvendig å gjøre mer

spesifikke forsøk der grenseverdiene for de ulike miljøparametrene utfordres. Målet med disse forsøkene er å lære seg å beherske RAS-teknologien på en fleksibel måte, og å utvikle kunnskap og kontrollverktøy som skal sikre fiskens velferd i slike system. Det er viktig at denne kunnskapsutviklingen gjøres systematisk og med vitenskapelig standard, heller enn som resultat av prøving og feiling i kommersiell produksjon, jf. blant annet dyrevelferdloven § 8.

I neste omgang, punkt 2, vil velfungerende RAS-systemer representere en mulighet til å øke kvaliteten i fiskeforsøk som omhandler emner som ikke i utgangspunktet er knyttet til RAS, gjennom å tilby fisken et mer kontrollert og stabilt miljø. Det er et åpent spørsmål hvor lenge det vil ta før en når et slikt funksjonsnivå, men det er ikke usannsynlig at slike forsøk kan settes opp i løpet av kort tid. Dette kan for eksempel gjelde forsøk med fôrmidler, genetikk osv, som med fordel kan gjøres med stor presisjon i mindre enheter.

3.5 Miljøberikelse

Det er ingen tradisjon for å tenke på tiltak for miljøberikelse i forsøksfiskenheter. Med miljøberikende tiltak forstår vi introduksjon av innretninger eller tiltak som har som mål å øke trivsel. Dyrevelferdloven § 23 slår fast at dyr, uavhengig av art, skal holdes i et miljø som gir god velferd ut fra artstypiske og individuelle behov. Den teknologien som brukes i fiskeforsøk er i all hovedsak utstyr produsert for kommersiell produksjon. De fleste arter har en historie i kultur som begynner med forsøk i liten skala og under ekstensive forhold, der en bruker kunnskap om fiskens naturlige miljø for å lære seg å mestre reproduksjon og yngelproduksjon. Med økende kunnskapsnivå og grad av mestring går utviklingen gjerne raskt i retning av standard enheter uten hensyn til fiskens naturlige preferanser. Sirkelformede kar er dominerende, både i produksjon og i forskning, og av hensyn til renhold brukes glatte flater og minst mulig av innretninger som kan bryte strømningsbildet. I akvariehold er det på den annen side langt mer variasjon i utforming av enheter.

Ulike observasjoner tyder på at det kan være en gevinst av miljøberikende tiltak for fisken i noen sammenhenger. Det bør ikke være en overraskelse dersom fisk, som andre dyr, vil foretrekke et miljø som inneholder elementer fra deres naturlige habitat. Det best dokumenterte eksemplet på bruk av miljøberikende innretninger i akvakultursammenheng er bruk av biomatter i klekkeenheter til laks, som gir en klar forbedring av resultater. Laksefisk i kar som er helt eller delvis dekket av lokk vil vise preferanse for skygge. Flatfisk setter tydelig pris på bunndekke av sand i karet, og det observeres at for eksempel kveite graver seg ned i sanden. Torsk er kjent for å være aktiv og rastløs i mæ, noe som bl.a. kan gi utslag i at den biter i stykker notveggen. Det diskuteres om torsk i mæ kan ha nytte av innretninger som lar den finne utløp for aggresjon og aktivitetstrang.

Samtidig er det flere betenkeligheter knyttet til miljøberikende tiltak i form av tekniske innretninger. Enhver installasjon i karet medfører fare for mekanisk skade som følge av kollisjoner, sammenstøt eller oppskraping. Hud og slimlag hos fisk er langt mer sårbar enn for eksempel pelsen hos et pattedyr. I mange sammenhenger er det også en vedvarende strøm i vannet, og fisken tvinges til konstant bevegelse. De fleste fiskeslag reagerer også på nærmest enhver ytre påvirkning med fluktreaksjon, det vil si svømming med stor hastighet uten retning, og i slike situasjoner økes faren for sammenstøt. Enhver innretning som bryter

vannstrømmen påvirker også strømningsbildet i karet, og kan hindre for eksempel selvrensing. Innretninger i karet medfører fare for groing og hindre renhold. Bunndekke i form av for eksempel sand kan påvirke det mikrobielle miljøet, og gi problemer med avløp. Det er derfor mange hensyn som må tas, og mange av disse momentene er spesifikke for fisk. I forsøkssammenheng som retter seg inn mot akvakultur er det også viktig at miljøet for fisken i forsøk er relevant for det miljøet resultatene skal brukes i. På den ene siden tilsier dette en viss tilbakeholdenhet i forhold til å introdusere nye elementer i forsøksenhetene, men på den andre siden ligger det et potensial for å utvikle forbedringer i forsøksenheter som kan komme kommersiell produksjon til nytte.

Det er grunn til å vurdere spesifikt potensialet for bruk av miljøberikende tiltak i forsøksenheter for fisk. Studier av atferd hos arten i naturlige omgivelser bør sammenholdes med atferd i karenheter, med tanke på å identifisere viktige forskjeller som kan videreutvikles til miljøberikende tiltak. Samtidig bør det være mulig å dra veksler på kunnskap som er opparbeidet i akvariehold, i forhold til metoder og tiltak som er i bruk her. Enkle preferansestudier som bygger på slike observasjoner vil kunne øke forståelsen av hvilke tiltak som er formålstjenlige, og praktisk mulige å gjennomføre. Samtidig er det behov for forskning på hvordan man kan redusere negative konsekvenser av miljøberikelse.

3.6 Harmonisering av karmiljø

Harmonisering av karmiljø er det viktigste tiltaket for å redusere variasjon mellom kar, ofte kalt kareffekt. Redusert variasjon mellom kar øker presisjonen i observasjonene, og derigjennom verdien av forsøket (økt refinement). Oppsett som gir høg reproduktibilitet mellom kar (liten kareffekt) kan gi sikre observasjoner ved bruk av færre replika (reduksjon) enn oppsett som skjermes av store kareffekter.

Vår kunnskap om hvordan ytre miljø påvirker fiskens utvikling og kroppsfunksjoner er under oppbygging, og er foreløpig langt fra komplett. Det er derfor en utfordring å fange opp flest mulig av forstyrrende elementer i miljøet rundt fisken, og eliminere, eller kontrollere og harmonisere dem i alle forsøksenheter. Det er en kompliserende faktor at de fleste forsøksenheter er små sammenliknet med karenheter for kommersiell bruk, og at mye teknisk utstyr må tilpasses spesielt.

Mange av de miljøfaktorene det er viktig å harmonisere er kjente faktorer. Forskjellene mellom kar kan være godt innenfor artens toleranseområde, og ville ha vært ubetydelige i produksjonssammenheng, men de kan likevel bidra til unødvendig støy i forsøksoppsett og uforklarlig variasjon i resultater. Vannkvalitet og vanntilførsel til forsøksenheter byr på spesielle utfordringer i denne sammenhengen. Det må sikres samme vannkvalitet i alle enheter, med tanke på for eksempel gassmetning og temperatur. Ved tilsetning av oksygen til kar med høye biomasse og god vekst kan selv små forskjeller i tilvekst gi ulik oksygenmetning. På samme måte kan forskjeller i vannutskiftning gi forskjeller i CO₂-nivå i karvannet, og små vannmengder gjennom rør av liten diameter kan gi temperaturfall før vannet når karet. En lite påaktet faktor er vannhastighet. Ved samme vannutskiftning kan strømningsbildet i karet være svært ulikt, avhengig av utforming og justering av innløp og utløp. Høy vannhastighet gir påtvunget høy svømmehastighet, og lite er kjent om hvor grensene går, mens lav vannhastighet påvirker på den andre siden fiskens sosiale

interaksjoner. Det må også gjøres valg med hensyn til lys. Bakgrunnsbelysning fra tak kan gi ulike lysnivå og forskjeller i skyggevirking i kar. Bruk av separate lyskilder for hvert kar er et alternativ, men gamle og nye pærer kan gi ulikt lys, selv om de i utgangspunktet er av samme type.

Effekten av andre ytre påvirkninger som for eksempel menneskelig aktivitet er vanskeligere å definere, og må sannsynligvis studeres som stresseffekter. I en forsøksavdeling må det forventes et høyt aktivitetsnivå både i forbindelse med røkt og stell, og i forbindelse med ulike forsøksaktiviteter som forsøksstart og prøveuttak. De fleste fiskeslag som er aktuelle for forsøk blir lett forstyrret av menneskelig aktivitet, selv om det også er forskjeller i tamhet mellom ulike populasjoner innen en art. I en fiskeavdeling vil en likevel få fluktreaksjoner hos fisken hver gang et menneske passerer, og den totale belastningen for hvert kar vil påvirkes av karetts plassering i forhold til gangveier, arbeidsbenker osv. Fra kommersielt oppdrett er det bl.a. rapportert om erfaringer med at oransje kjeledresser forstyrrer fisken mer enn klær av mørk farge! Andre ytre påvirkninger som støy og vibrasjoner kan være vanskelig å unngå, og utfordringen blir å sikre mest mulig lik belastning for alle enheter. Det finnes erfaringer for at banale ting som at vedvarende kondensdrypp i kar har påvirket forsøksresultater.

Behovet for nøyaktighetsgrad når det gjelder harmonisering vil variere med forsøksformålet for mange av disse parametrene. På de fleste av disse områdene eksisterer det også betydelig uformell kompetanse omkring på forsøksavdelingene, men det finnes ingen felles standarder. Slike spørsmål er også lite diskutert i de fiskeforskningsrelaterede fagmiljøene, til forskjell fra situasjonen i andre forsøksdyravlager.

3.7 Skalering av forsøksenheter

Riktig valg av størrelse på forsøksenheter er en stor utfordring. Spennet i forsøk som er gjort i nyere tid er vidt, fra innledende forsøk med kveitelarver der individene ble plassert enkeltvis i brønnene på et nunc-brett, til dagens vaksineforsøk der gruppestørrelsen er på mange hundre tusen og der fisken går i store mærer som del av kommersiell produksjon. I en vanlig forsøksavdeling for fisk er størrelsesspenntet i tilgjengelige enheter adskillig mindre, men skal fremdeles dekke fisk av ulike arter, størrelser og livsstadier.

Valg av karstørrelse i forhold til fiskestørrelse er svært viktig. Dyrevernsloven § 4 setter krav til "tenleg tilhaldsrom der det er stor nok plass", og for fisk må vi forstå dette som karstørrelse / vannvolum. Dette kravet er videreført i dyrevelferdsloven § 23 selv om denne er mer generelt utformet. Sannsynligvis er forholdet mellom fiskestørrelse og karstørrelse et problem i begge ender av skalaen: Stor fisk i små kar og små fisk i store kar. Dette er i stor grad en uavklart problemstilling der det er stort behov for mer kunnskap.

Motivasjonen for å holde stor fisk i små kar er som regel å kunne kjøre kontrollerte forsøk med mange replikater også med slik fisk. Men stor fisk i for små kar vil ikke kunne bevege seg på en måte som er naturlig for arten. Laks som når en størrelse på for eksempel 1 kg vil kolliderer med karvegg nærmest hver gang den forsøker å svømme, hvis karet er for lite. Laks som har gått under slike forhold kan få innetrykt snuteparti. Flatfisk, som kveite, vil få problemer med normal fôringsatferd dersom det er for lite plass. Sannsynligvis påvirker karstørrelsen også den generelle trivselen, uten at vi har noe godt mål for dette foreløpig.

Ved mangelfull kunnskap kan blant annet en sammenligning med naturlig levemiljø gi en indikasjon på fiskens trivsel.

Utviklingen i oppdrettsnæringen går i retning av større og større enheter, også til liten fisk. De fleste oppdrettskar baserer seg på selvrensingsprinsippet, der mest mulig av ekskrementer og partikler føres ut med vannet. For at dette prinsippet skal fungere er det imidlertid nødvendig med en viss vannstrøm, og strømmen må være kraftigere jo større karene er. I forbindelse med resirkulering vil behovet for høy vannutskiftning i karene være tilstede uansett fiskestrørrelse, og vannstrømmen kan bli svært sterk hvis den ikke kontrolleres. Liten fisk i store kar risikerer å bli påtvunget en svømmehastighet som er for høy i forhold til størrelse og kapasitet for arten. I resirkuleringssammenheng er dette problemet aktuelt nærmest uavhengig av fiskestørrelse.

Kunnskapen om karhydraulikk i forhold til størrelse på enheter ble viet en del oppmerksomhet på 1990-tallet, og det ble utviklet noen grunnleggende modeller som beskriver disse sammenhengene. Denne kunnskapen har i liten grad blitt tatt i bruk, og har behov for oppgradering og videreutvikling. Samtidig finnes det mye kunnskap om maksimal svømmehastighet på ulike størrelser i den biologiske litteraturen, målt som U_{crit} . Denne verdien beskriver den svømmehastigheten der fisken ikke lenger klarer å svømme mot strømmen og slipper seg bakover med strømmen. Kar med slike forhold kan observeres både i kommersielle anlegg og i forsøksavdelinger, uten at det synes å være hensikten fra dem som har ansvar for fisken. Det er all grunn til å tro at dette har negative effekter på for eksempel stressnivå, og hos torsk er det nylig vist at langvarig svømming ved hastigheter like under U_{crit} induserer misdannelser i ryggraden. Det som spesielt mangler til bruk både i forsøksenheter og i akvakultur er imidlertid kunnskap om hvilken svømmehastighet fisken foretrekker, og hvor sterk strøm den kan tåle over lang tid. Et nyere forsøk med styrt svømmehastighet til laksesmolt viste positiv treningseffekt på fisken, større vektøkning og bedre motstandskraft mot sjukdomssmitte hos smolt som fikk langvarig, moderat trening. Registreringer av atferd i kar viser også store forskjeller i atferd mellom laksesmolt med høy og lav vannhastighet, og der fisken tilsynelatende hadde en mer kontrollert atferd når det var en viss strøm. Eksisterende studier gir imidlertid bare indikasjoner, og det er behov for å følge opp med systematiske studier på dette området.

Dette fagområdet kompliseres av mangelfulle metoder for å kvantifisere vannhastigheten. Det er få tilgjengelige målemetoder, og de gir resultater av usikker kvalitet og/eller krever komplisert og kostbart utstyr. Dette er særlig en utfordring i små enheter.

Tilvenningsproblemer ved overgang fra store til små kar er et vanlig problem i forsøksvirksomhet. For å få en fiskeavdeling til å fungere er det nødvendig å ha populasjoner av potensiell forsøksfisk gående til enhver tid, og den mest rasjonelle måten å oppstalle disse dyrene på er i større samlekar. Problemene oppstår når fisk hentes ut fra større kar (for eksempel 3-5m Ø) og settes i mindre kar (for eksempel 1m Ø). Overgangen er enda større hvis fisk hentes fra mæer og settes i relativt små kar. Det er en vanlig erfaring at dette gir dårlige resultater, og at fisken vil sture på ubestemt tid. Det finnes mange eksempler på publiserte studier der en kan mistenke at noe slikt har skjedd. Det er av betydning å kunne klarlegge og dokumentere hva som skjer, og hvorfor, i en slik situasjon, med tanke på å forstå hvilke begrensninger som eksisterer og å finne strategier som fungerer.

En egen utfordring er knyttet til forsøk i merd. Oppdrettsnæringen har i de senere årene gått mot stadig større enheter og i dag er merder med omkrets på 160 m dominerende. I tillegg til at store oppdretsenheter ikke egner seg til å gjennomføre de fleste typer forsøk, er de også spesielt utsatt for hypoksi i de mest kritiske periodene av året. Mange av forsøkene knyttet til vaksineutvikling og uttesting av disse gjennomføres i kommersielle anlegg. Dette er behandlet i et eget kapittel. I den andre enden av skalaen gjøres forsøk i merder på 5x5 hvor fisken opplever store miljøvariasjoner, vokser dårligere og er spesielt utsatt for kjønnsmodning. I merdforsøk er det derfor en balansegang gjennom ønsket om å ha det ønskede antall gjentak og et lavt antall forsøksdyr mot ønsket om at forsøket ska ha relevans for den næringen som forsøket omhandler.

3.8 Gruppestørrelser og sosialt miljø

Gruppestørrelse er en faktor som må vurderes i planlegging av forsøk. Utgangspunktet i forsøksdyrvirksomhet er generelt å bruke så få dyr som mulig, det vil si å redusere gruppestørrelsene til et minimum.

Den vanlige måten å vurdere fiskemengde og biomasse pr. enhet på er tetthet, dvs. kg fisk/m³. Akvakulturdriftsforskriftene angir øvre grenser for tetthet, og det er sjelden aktuelt å overskride disse i forsøkssammenheng, annet enn når dette er et forsøksspørsmål i seg selv. Fisk i kar er flokkdyr, og en må også vurdere sosiale interaksjoner. I enheter med få individer kan det dannes sosiale hierarkier som er til ulempe både for fisken og forsøksformålet. Hierarkidannelse i et karmiljø vil bl.a. gi størrelsesspredning og ulik utvikling mellom individene, noe som i de fleste tilfeller vil svekke verdien av resultatene.

Ved oppsett av forsøk må valg av gruppestørrelse derfor også ta hensyn til sosialt miljø og gruppeatferd for den aktuelle arten og størrelsen. I et startforingsforsøk med laks kan det for eksempel i et tenkt tilfelle være tilstrekkelig med 50 fisk pr kar av hensyn til forsøksformålet, mens praktisk erfaringer viser at det kan være nødvendig med 300 fisk pr kar for å få fisken til å fungere optimalt.

Slike vurderinger baseres nå i stor grad på skjønn og erfaring. Det er lite dokumentasjon av gruppeatferd i kar, og metodene for å studere sosialt miljø i kar er lite utviklet. Tradisjonelle atferdsstudier omhandler i stor grad enkeltindivider. I siste tiår har det vært god utvikling med hensyn til å studere atferd i mærd, men et tilsvarende fokus på atferd i karmiljø har manglet.

Bruk av enkeltfiskammer kan være nødvendig i enkelte typer forsøk, for eksempel i atferdsforsøk, i enkelte respirasjonsoppsett og ved bruk av fisk med innopererte kanyler. Sannsynligvis er det en betydelig påkjenning for fisken å bli isolert, og det anbefales å begrense slike oppstillingsmåter til et nødvendig minimum.

3.9 Sebrafisk – en liten fisk med et stort potensial

På verdensbasis har sebrafisk i løpet av kort tid blitt en populær modellfisk i utviklingsbiologisk og biomedisinsk forskning. Ved siden av lave kostnader skyldes populariteten til sebrafisk som forsøksdyr at embryo og larver er transparente med en rask utvikling utenfor fiskekroppen. En voksen sebrafisk hunn legger ca 200-300 egg i uken, og stor-skala forsøk er mulig å gjennomføre. Sebrafisk embryo kan lett eksponeres for fremmedstoffer via vannet. I legemiddelindustrien benyttes i stadig større grad sebrafisk embryo (som ikke omfattes av dyrevernloven eller dyrevelferdsloven § 2) for å avdekke eventuelle toksiske effekter av ulike doser legemiddel før det evt. testes videre i pattedyrmodeller. Dette samsvarer med "trappetrinn-prinsippet". I en prinsippavgjørelse anså Forsøksutvalget det unødvendig å utsette fisk for lidelser dersom kjemikaliene viser seg å være tilstrekkelig giftige for alger (*Skeletonema costatum*) eller hoppekrepsdyr (*Acartia tonsa*). Utvikling av sebrafisk embryo benyttes på samme måte innen toksikologien for å kartlegge toksiske effekter av for eksempel miljøgifter. Andre stadier av sebrafisk kan enkelt eksponeres for ulike forsøksoppsett, og ved farmakologisk eller toksikologisk uttesting på voksne individer kan substans av interesse tilsettes i vannet eller i føret. Sebrafisk vil bli mer brukt i fremtiden etter hvert som de ulike forskningsmiljøene i Norge blir bevisste de mulighetene som ligger i denne modellfisken.

Tabell 3.2 Anbefalte miljøbetingelser for sebrafisk.

| Parameter | Akseptabelt område | Foretrukket nivå |
|--------------|--------------------|------------------|
| Temperatur | 23-29°C | 25-28°C |
| pH | 6,0-8,0 | 7,2 |
| Ledningsevne | 450-1000 µS | 700-900 µS |
| Alkalinitet | 50-200 ppm | 170 ppm |
| Hardhet | 4-8 dGH | 6 dGH |
| Ammonium | 0 | 0 |
| Nitritt | 0-25 ppm | 0 ppm |
| Nitrat | 0-40 ppm | 10 ppm |

Optimale miljøforhold for sebrafisk er allerede godt beskrevet i litteraturen og gitt i Tabell 3.2. Krav til vannkvalitet er etablert over mer enn 30 års forskning og laboratorier som bruker sebrafisk følger internasjonalt etablerte standarder. Harmonisering av miljøet åpner for betydelig større mulighet for sammenligning av resultater på tvers av forsøkslokaliteter en for hva som er tilfellet for de kommersielle fiskeartene det drives mye forskning på i Norge i dag. I tillegg krever hold av sebrafisk liten plass.

I Norge er bruken av sebrafisk økende, og er i størst grad knyttet til studier av virveldyrenes utvikling og geners funksjonalitet. I forskningsmiljøene som benytter tradisjonelle forsøksdyr som mus og rotter betraktes bruk av sebrafisk som et bidrag til de 3 R-ene. Det har ført til ulik "prising" av fisk i forhold til pattedyr. I den sammenheng er det behov for en bevisstgjøring på at de 3 R-ene ikke skiller mellom dyr så lenge de omfattes av Dyrevelferdsloven.

Sebrafisk er ikke nødvendigvis bare en god modell for pattedyr, men representerer også en god modell for andre fiskearter. Den utstrakte forskningen på fisk i Norge i dag er i stor grad knyttet opp til akvakulturnæringen. I og med at sebrafisk lett kan holdes under svært harmoniserte og kontrollerte miljøbetingelser vil den være en god modell også for oppdrettsarter. Det er viktig å presisere at sebrafisk ikke kan erstatte all fisk i akvakulturrelatert forskning, men brukes i komparativ screening for å etablere et grunnlag for mer fokuserte forsøk på andre fiskearter. I et fremtidsperspektiv kan større bruk av sebrafisk bidra til å redusere antall fisk som brukes i forskning.

De mange genmodifiserte stammene av sebrafisk er vanligvis godt beskrevet med hensyn til utvikling, organdannelse og organfunksjon. Disse karakteristikkene representerer et nyttig verktøy for å identifisere gode og sensitive endepunkt i et forsøk.

Utdypende informasjon om sebrafisk:

Westerfield, M. (2007) THE ZEBRAFISH BOOK, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press.
http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html (4th edition)

Nüsslein-Volhard, C. and Dahn R (red.) (2002) Zebrafish - A Practical Approach, Oxford University Press

Koichi Kawakami, Andrew C. Oates, Graham J. Lieschke (red.) (2010) Zebrafish: Methods and Protocols. I serien: Methods in Molecular Biology; (546) DOI: 10.1007/978-1-60327-977-2

The Zebrafish Model Organism Database
<http://www.zfin.org/>

Zebrafish Genome Browser at ENSEMBL
http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index

The European network on Fish Biomedical Models
http://itgmv1.fzk.de/eufishbiomed/eufish_main.htm

3.10 Forskningsbehov

3.10.1 Temperatur

- Økt kunnskap om optimale temperaturforhold for ulike livsstadier for de aktuelle artene.
- Økt kunnskap om de biologiske effektene av temperaturforskjeller på ulike nivå i organismen, fra vekst og utvikling til celler og vev, og med støtte i studier av genuttrykk.
- Identifisere velferdsindikatorer som kan beskrive temperaturrelaterte problemstillinger
- Videre utvikling av cellekulturstudier som redskap for å undersøke temperatureffekter hos fisk
- Utvikle fisk som modelldyr for temperaturstudier hos andre arter

3.10.2 Vannbehov og miljøforhold for fisk i forsøk

- Når en har svært like replikater så kan en bruke færre replikater i forsøkene og dermed reduserer en antall fisk i forsøket. Da må en imidlertid ha daglig kontroll av pH og oksygen i avløpet på oppdrettsbassengene. Her er det nødvendig med omfattende forskningsaktivitet for å undersøke om det er mulig å redusere antall replikater og fisk i forsøk.
- Vi kan ha samvirkende effekter av pH; karbondioksid, labilt Al, nitritt og ammonium for lavere verdier enn det som er angitt. Det betyr at en må forske på egne vannkvalitetskriterier for fiskeforsøk.
- En kan blant annet ikke operere med høye d-verdier og konsentrasjoner av karbondioksid opp mot grenseverdien i et forsøk som omhandler andre parametre enn karbondioksid. Det er viktig med teoretisk tilnærming på hva miljøforholdene i en kontrollgruppe skal være samt eksperimentelle forsøk.
- Videre forskning er nødvendig for å forenkle måle metodene for respirasjonsfrekvensen til fisk i forsøk.
- Hvordan en starter opp forsøk er også viktig, for eksempel om en øker konsentrasjonen hurtig eller bruker en gradvis tilvenning til eksperimentelle betingelser.

3.10.3 Forsøk med fisk i resirkuleringssystemer (RAS)

- Identifisere kritiske miljøbetingelser som er særegne for RAS-systemer.
- Kartlegge hvilke indikatorer knyttet til velferd og helse som er spesielt aktuelle for RAS.
- Videreutvikling av løsninger for styring og overvåking av RAS-systemer i forsøksskala.

3.10.4 Miljøberikelse

- Det bør gjennomføres en sammenliknende studie av atferd under naturlige forhold og i kar hos noen aktuelle arter, med tanke på å identifisere trekk ved naturlig atferd som ikke dekkes i kar.
- Relevant kunnskap fra akvariehold bør oppsummeres og spilles inn i dette arbeidet.
- Finne tiltak som forebygger uheldige virkninger av miljøberikelse

3.10.5 Harmonisering av karmiljø

- Systematisk analyse av hvilke faktorer som inngår i karmiljø, med utvikling av undervisningsopplegg til bruk i opplæring av forskere og teknisk personell.
- Utvikle standarder for evaluering av karmiljø.

3.10.6 Skalering av forsøksenheter

- Det er behov for en samlet vurdering av forholdet mellom fiskestørrelse, karstørrelse, karhydraulikk og svømmekapasitet, og å utvikle matematiske modeller som beskriver disse sammenhengene.
- Det bør gjøres atferdsstudier for å finne anbefalt og nedre grense for forsvarlig karstørrelse til stor fisk av ulike arter.
- Kunnskapen om sammenhengen mellom svømmehastighet og fiskevelferd bør dokumenteres bedre.
- Optimal svømmehastighet bør bestemmes for ulike størrelser hos de viktigste artene
- Det trengs metoder for å måle strømhastighet i kar av ulike størrelser.
- Strategier for vellykket overgang mellom ulike karstørrelser, med vekt på begrensende faktorer.

3.10.7 Gruppestørrelser og sosialt miljø

- Studier av ulike gruppestørrelser med tanke på å finne atferds- og andre indikatorer til hjelp for å bestemme optimale gruppestørrelser i forsøk.

3.10.8 Sebrafisk

- Sebrafisk som modell i akvatisk translasjonell forskning.

3.11 Referanser

Albokhadaim, I., Hammond, C.L., Ashton, C., Simbi, B.H., Bayol, S., Farrington, S., Stickland, N. 2007. Larval programming of post-hatch muscle growth and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Biology*, 210, 1735-1741.

Aure, J., Oppedal, F. og Vigen, J., 2009. Hva bestemmer vannutskifting og oksygenforhold i oppdrettsmerder? I: Agnalt, A.-L., Bakketeig, I.E., Haug, T., Knutsen, J.A. og Opstad, I., *Kyst og Havbruk 2009, Fisken og Havet, særnummer 2-2009*, 169-171.

Bæverfjord, G., Åsgård, T., Lein, I., Rye, M., Vassvik, V. og Storset, A., 1998. Høg temperatur i rognperioden inducerer misdannelser hos laks. *Norsk Fiskeoppdrett*, 3/98, s. 28-30.

Bæverfjord, G., Espmark, Å., Helland, S., Lein I. & Witten, P.E. 2006 Temperatur i smoltproduksjonen er en nøkkelfaktor. *Norsk fiskeoppdrett*, 10: 55-57.

Colt, J., and Orwicz, K., 1991. Modelling production capacity of aquatic culture systems under freshwater conditions. *Aquacultural Engineering* 10,1-29.

Ervik, A., Agnalt, A.-L., Asplin, L., Aure, J., Bekkvik, T.C., Døskeland, I., Hageberg, A.A., Hansen, T., Karlsen, Ø., Oppedal, F., Strand, Ø. 2008. AkvaVis – dynamisk GIS-verktøy for lokalisering av oppdrettsanlegg for nye oppdrettsarter. *Miljøkrav for nye oppdrettsarter og laks. Fisken og Havet nr 10. 2008. 90 sider.*

Fivelstad, S. 1988. Waterflow requirements for salmonids in single pass and semi-closed landbased seawater and freshwater systems, *Aquacultural Engineering*, 7, 183-200.

Fivelstad, S. and Binde M. 1994. Effects of reduced waterflow in softwater on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) while maintaining oxygen at constant level by oxygenation of the inlet water. *Aquacultural Engineering*, 13, 211-238.

Fivelstad, S., Olsen, A.B., Wågbø, R., Stefansson, S., Handeland, S., Waagbø, R., Kroglund, F. and Colt, J., 2004. Lack of long-term sublethal effects of reduced freshwater pH alone on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts subsequently transferred to seawater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61, 511-518.

Fivelstad, S., Waagbø, R., Zeitz, S., Hosfeld, A.-C.- D., Olsen, A.B., and Stefansson, S., 2003a. A major water quality problem in smolt farms: Combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture* 215, 339-357.

FOR, 2004. Regulations relating to operations of aquaculture establishment. FOR 2004-12-22 no. 1785 paragraph 19. Norwegian Ministry of Fisheries and Coastal Affairs.

Galloway, T.F., Bardal, T., Kvam, S.N., Dahle, S.W., Nesse, G., Randøl, M., Kjørsvik, E., Andersen, Ø. 2006. Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of MyoD. *Journal of Experimental Biology*, 209, 2432-2441.

Kittelsen, A., Rosten, T., Ulgenes, Y., Selvik, J. og Alne, H. (2006). Available fresh water sources for future production of smolts of Atlantic salmon and trout (in Norwegian). In Norwegian. *AKVAFORSK report*, pp. 123.

Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *The Journal of Experimental Biology* 201, 165–168.

Lein, I., Poppe, L.T., Barr, Y., Hjelde, K., Helland, S., Takle, H., Andersen, Ø. & Bæverfjord, G. 2006. Temperatur er viktig - også hos torsk! *Norsk fiskeoppdrett*, 4: 56-57.

Moe, H., Dempster, T., Sunde, L.M., Winther, U., Fredheim, A. 2007. Technological solutions and operational measures to prevent escapes of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from sea cages. *Aquaculture Research*, 38, 91-99.

Takle, H., Bæverfjord, 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.

Terjesen BF, Ulgenes Y, Fjæra SO, Summerfelt ST, Brunsvik P, Bæverfjord G, Nerland S, Takle H, Norvik OC, Kittelsen A (2008). RAS research facility dimensioning and design: A special case compared to planning production systems. *In Aquaculture Engineering Society Issues Forum, proceedings*. p. 223-238. Roanoke, Virginia, 23rd-24th July, 2008.

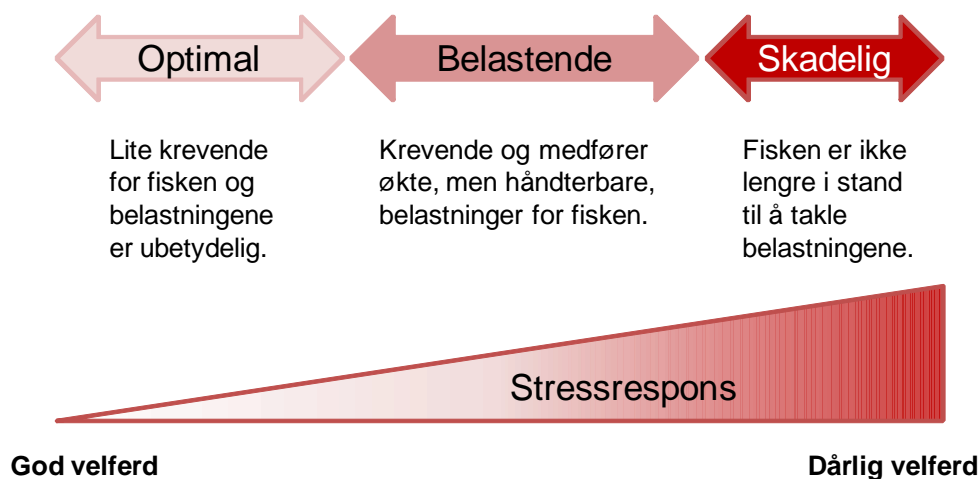
4 Velferdsindikatorer

Øyvind Aas-Hansen, Trond Brattelid, Grete Bæverfjord og Åsa Espmark

Det er anerkjent at dyr har egenverdi, noe som også er slått fast i dyrevelferdsloven § 3. Lovens formål er å fremme god dyrevelferd og respekt for dyr. For fisk i forsøk er i tillegg god dyrevelferd og kunnskap om dette oftest en forutsetning for å sikre en vitenskapelig god kvalitet på forskningen som gjøres. Hvis for eksempel forsøksfisk er utsatt for redusert velferd uten at forsøkshaverne er klar over det kan dette utgjøre en alvorlig feilkilde når resultatene skal tolkes. For å kunne fastslå at fisk i forsøk har tilfredsstillende velferd er man avhengig av å kunne bestemme dette ved bruk av validerte velferdsindikatorer.

Begrepet velferdsindikator er relativt nytt i forhold til akvatiske organismer. I rapporten "Forskningsbehov innen dyrevelferd i Norge" (NFR 2005) ble dette omtalt under et eget kapittel om velferd i akvatisk produksjon. Senere har rapporten "Dyrevelferd i akvatisk dyrehold - herunder fremtidens dyrehold" oppsummert kunnskapsstatus på dette området, med vekt på å foreslå velferdsindikatorer som kan brukes i en oppdrettssituasjon. Rapporten omhandler de artene som er aktuelle i oppdrett i Norge, og presenterer forslag til velferdsindikatorer for hver av disse, basert på tilgjengelig kunnskap. Det eksisterer også flere internasjonale rapporter som delvis omhandler velferdsindikatorer for fisk, men også disse fokuserer hovedsakelig på kommersielt hold.

Velferdsindikator er en målbar indre (på eller i fisken) eller ytre (fiskens fysiske eller sosiale miljø) parameter hvis variasjon på forutsigbart vis er knyttet til variasjon i fiskens velferdsstatus.



Figur 4.1 Velferd kan også beskrives med hvor godt fisken takler og hvor mye resurser den bruker på å takle stress.

I tillegg til fokus på fravær av belastninger skal det etter dyrevelferdsloven legges økt fokus på positive emosjoner og trivsel hos dyr. Velferdsindikatorer for fisk i forsøk er langt på vei sammenliknbart med oppdrettssituasjonen, men byr på noen ekstra utfordringer. Fisk i forsøk vil i de fleste tilfeller holdes i mindre grupper enn i oppdrettssammenheng. Fisken vil

som regel bli utsatt for mer og hyppigere håndtering enn fisk i ordinært oppdrett. Mange forsøk innebærer også direkte inngrep eller miljømanipuleringer som har som mål å framkalle reaksjoner hos fisken. I ytterste konsekvens kan målet være å framkalle sykdom og død, som for eksempel i smitteforsøk. I forsøkssammenheng er det derfor behov for mer utfyllende og nyansert kunnskap om de observasjonen vi gjør og hva de betyr for fiskens velferd. Samtidig vil en ofte stå overfor situasjoner der målet med et forsøk nettopp er å finne slike sammenhenger, og der en for å finne sikre svar må utfordre f.eks. grenseverdier for miljøkrav eller utsette fisken for behandling som forventes å kunne være belastende. I forsøkssammenheng vil en som regel ha langt bedre muligheter til å overvåke og analysere både miljøforandringer og fiskens velferd. Det er viktig at slik kunnskap samles og systematiseres, slik at det bygges opp vitenskapelig dokumentasjon på dette området som bringer kunnskapen framover. Ved å gjøre kunnskapen tilgjengelig kan man få redusert antall forsøk.

4.1 Kriterier for valg og validering av velferdsindikatorer

En velferdsindikator kan defineres som en målbar indre (på eller i fisken) eller ytre (fiskens fysiske eller sosiale miljø) parameter hvis variasjon på forutsigbart vis er knyttet til variasjon i fiskens velferdsstatus.

Ideelt sett bør en velferdsindikator ha følgende egenskaper:

- Være kvantifiserbar og enkel å måle uten å innvirke på fiskens velferd.
- Være sensitiv for alle forhold som påvirker fiskenes velferd.
- Være spesifikk og ikke følsomme for forhold som ikke påvirker fiskenes velferd.
- Forevise gradert responskurve som samsvarer med fiskenes velferd.
- Tillate kontinuerlig og objektiv måling i alle individer i hele gruppen.
- Være anvendelig og sammenlignbar uavhengig av art og livsstadie.

Det sier seg selv at ingen velferdsindikator kan sies å være ideell. Man er derfor helt avhengige av at forholdene nevnt ovenfor kartlegges og valideres best mulig gjennom eksperimentelle studier og observasjoner der man benytter kombinasjoner av flere ulike velferdsindikatorer / måleparametre. På den måten kan mulighetene og begrensningene for hver enkelt velferdsindikator kartlegges slik at man har et best mulig grunnlag for å foreta et valg av velferdsindikatorer som er mest mulig relevante i forhold til de gitte forsøksbetingelsene.

1. *Nøytrale velferdsindikatorer er velferdsindikatorer som kan måles i miljøet uten å håndtere eller på annen måte forstyrre forsøksfiskene.*
2. *Kontinuerlig observerbare velferdsindikatorer er velferdsindikatorer som kan måles kontinuerlig ved observasjon uten å håndtere eller på annen måte forstyrre forsøksfiskene.*
3. *Biologisk ("direkte") velferdsindikator er en velferdsindikator hvis måleparameter beskriver faktiske variasjoner i fiskene eller fiskegruppen som på forutsigbart vis er knyttet til variasjon i fiskenes velferdsstatus.*

4.2 Klassifisering av velferdsindikatorer hos fisk

Dyrevelferd i akvatisk dyrehold – herunder fremtidens dyrehold (NIVA rapport LNR 5469-2007) foreslår følgende inndeling av velferdsindikatorer hos fisk:

- Fysiologiske indikatorer
- Atferdsindikatorer
- Morfologiske indikatorer
- Fysisk helse
- Indirekte velferdsindikatorer (tilsvarende kapitlet om miljøkrav i denne rapporten)

Velferdsindikatorer kan alternativt klassifiseres på bakgrunn av hvorvidt de tillater kontinuerlig eller punktvis måling, og i forhold til grad av mulig innvirkning på forsøksfiskene. Eksempler på parameter som kan fungere som velferdsindikatorer for fisk i forskning er gitt under.

1. Kontinuerlig observerbare ytre (nøytrale) velferdsindikatorer

- Fysiske og biologiske miljøparametre (ytre miljø) (f.eks. vanntemperatur, salinitet, oksygenmetning, lysforhold, strømhastighet, signalstoffer og metabolitter i vann).
- Observerbar morfologi (deformiteter, finneslitasje), fysiologi (gjellelokkbevegelse, fargeforandring) og helse (synlige skader, sår, infeksjoner, parasitter mv.).
- Atferd (f.eks. svømmemønster, ”sturing”, snubevegelser, biting).
- Andre observerbare biologiske egenskaper (e.g. elektrisk felt for fjernmåling av hjertefrekvens, biomassemålere, fôrintak og ”feed waste collectors”).

2. Kontinuerlig observerbare ikke-nøytrale velferdsindikatorer

- Atferdsobservasjoner på merket fisk med videoanalyseprogrammer (f.eks. Ethovision; nær-nøytral).
- Telemetri for atferd (posisjonering, bevegelse og dybde, snapp av fôrpellets).
- Fysiologisk telemetri (SmartTag for respirasjon, hjertefrekvens/ EKG/ blodstrøm, EMG, sympatikusaktivitet, EEG/hjerneaktivitet; nær-nøytrale).
- Telemetri for helse og immunologi (nær-nøytrale).
- Kannuleringsforsøk der fisk har et kateter i en blodåre (vanligvis dorsalaorta) for gjentatte uttak av blodprøver på ikke-bedøvet fisk.
- Oksygenforbruk (respirometer).

3. Prøvetakinger på bedøvet eller avlivet fisk

- Indre anatomi / histologi / morfologi.
- Molekylære og biokjemiske markører.
- Neuroendokrine markører (hormoner og signalstoffer).
- Immunologiske / helse.

I tillegg er det ut fra forsøkenes design viktig å vurdere om målinger på individ og/eller gruppenivå er mest relevant (se punkt 4.3 nedenfor).

4.2.1 Faktorer som kan påvirke forsøksfiskenes velferd

- Fysisk miljø, herunder vannkvalitet (f.eks. vanntemperatur, oksygenmetning, pH etc). Krever kunnskap om fiskenes behov for å sikre at alle miljøvariabler og kombinasjoner av disse faller innenfor fiskenes optimalområde (med mindre forsøket tilsier noe annet).
- Fôr og ernæring. Krever kunnskap om fôring og ernæring slik at adekvate fôringsprotokoller, fôrets beskaffenhet, palatibilitet, næringsinnhold og sammensetning tilfredsstiller dyrenes behov.
- Patogener og helsestatus.
- Frykt og smerte.

4.3 Positive og negative velferdsindikatorer på individ og gruppenivå i forsøk

Velferdsindikatorer og dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt overlapper delvis, ved at de i stor grad bygger på samme kriterier, som f.eks. stressreaksjoner og atferd. Velferdsindikatorer benyttes for å bestemme hvor bra eller dårlig fisken har det mens endepunkt er en definert "terskel" som setter en grense for hvor mye belastning i form av stress, ubehag og smerte vi er villige til å utsette, i dette tilfellet, forsøksfisken for i et forsøk. Uansett må risiko for belastninger ligge innenfor dyrevelferdslovgivningen og tillatelse fra Forsøksdyrutvalget eller ansvarshavende ved en forsøksdyravdeling. Også når en ser at målet med forsøket ikke kan nås (forsøket slår feil), er utgangspunktet at forsøket har nådd endepunktet. Ved uforutsett smerte som ikke kan lindres, skal dyret avlives umiddelbart, jf. forskrift om forsøk med dyr § 14. Her har forskriften definert et endepunkt.

I forbindelse med forsøk på fisk brukes begrepet velferdsindikator stort sett om indikatorer som avviker fra normalen og beskriver en stress eller lidelsestilstand for fisken. Det tilsynelatende fraværet av positive velferdsindikatorer skyldes i stor grad at det er lettere å skape empati for negative enn positive erfaringer med fisk. Med det som utgangspunkt vil normal atferd og fysiologiske parametere som ikke avviker fra normalen i negativ retning betraktes som positive velferdsindikatorer. Med andre ord en fisk som oppfører seg normalt uten stressrespons har det etter forholdene bra, og det er vanskelig å observere at fisken har det bedre enn normalt. Det er imidlertid mulig å summere sammen flere velferdsindikatorer og gi et mer sammensatt bilde av fiskens velferd. Fisk vil alltid være eksponert for stress fra miljøet i en eller annen form, og det er derfor rimelig å anta at det vil være mulig å gi graderte score på enkelte velferdsparametere. Det er mulig med individ og gruppescore. Individscore gir en indikasjon på et enkelt individs velferd, mens en gruppescore basert på et representativt utvalg eller hele gruppen sier noe om velferden innad i en gruppe. I og med at gruppescore representerer et gjennomsnitt utelukker det derfor ikke at enkeltindivid i gruppen kan ha dårlig velferd. Det er imidlertid viktig å ta hensyn til at forsøksbetingelsene dels er gode, fisken er beskyttet og får mat, og er derfor ikke nødvendigvis like utsatt for stress og plager som i naturen. Selve forsøksbetingelsene i seg selv kan i utgangspunktet beskytte "sensitive individ" som lett blir påvirket av stress, smerte og ubehag og kan gi en kunstig negativ score på velferdsindikatorer i en gruppe. Forsøk skal uansett ikke utsette dyr for fare for unødige belastninger, og det er derfor viktig å definere hvilken populasjon av fisken som inngår i et forsøk. I motsatt fall kan en overrepresentering av "sterke individ"

skygge for en naturlig mer negativ velferdsscore. Når velferdsindikatorer anvendes på gruppenivå må det rettes spesiell oppmerksomhet mot de individer som kommer dårligst ut.

I forskning i mindre grupper i kar har man god mulighet til å følge opp og overvåke fisken. Gjennom daglig røkting danner man seg et godt bilde på fisken velferd hovedsakelig basert på atferd. Det er imidlertid viktig å ta hensyn til metode ved måling av de ulike fysiologiske velferdsparameterene. I og med at flere av parametrene baserer seg på en stressreaksjon kan selve prøvetakingen/målingen gi en lav velferdsscore som ikke er representativt for forsøket. Likeledes vil tilpasning til forsøksbetingelsene bety en god del for stressresponsen og velferdsscore. En alternativ fremgangsmåte ville være å identifisere velferdsindikatorer som ikke er individbaserte, men som baserer seg på indirekte måling av for eksempel miljøparametere og atferdsobservasjoner. Vannparametere som oksygeninnhold, nitrogen og stresshormoner i utløpsvann sammen med atferdsobservasjoner kan muligens benyttes som indirekte velferdsindikatorer (Tabell 4.1).

Spørsmålet i en forsøkssituasjon vil imidlertid alltid være "hva er normalt", da normalen avhenger av art, kjønn, livsstadie, årstid, temperatur, miljø og ikke minst lokalitet. Normalen vil derfor ikke nødvendigvis være den samme fra forsøk til forsøk eller fra forsøkslokalitet til forsøkslokalitet. I forsøkssammenheng vil alltid en eksperimentell gruppe vurderes opp mot en eller flere kontrollgrupper. Kontrollgruppen definerer da normalen i forsøket. Det er imidlertid viktig at kontrollgruppen i seg selv blir kontrollert mot en overordnet og etablert normal med definerte grenseverdier som anses som optimale for fisken. En slik overordnet normal må basere seg på en kunnskapsdatabase av vitenskapelig baserte og validerte parametere, men bør gjerne også sammenholdes med bakgrunnsdata fra stampopulasjonen for gjeldende fiskeart på den gjeldende forsøkslokalitet. Likeledes vil behovet for pilotstudier og observasjoner også i akklimeringsperioden være viktig for å identifisere og validere velferdsindikatorer i nye forsøk.

I helseovervåking av det vi forbinder med tradisjonelle laboratoriedyr som mus og rotter benyttes "sentinels" en gruppe som kun har som formål å monitorere helsestatus. Bruk av "sentinel" fisk i gruppene kan være en løsning på å overvåke velferdsindikatorer i grupper av fisk i forsøk. Dette kan gjøres med telemetri, hvor radiosender som måler ulike parametere i fisken sendes til en mottaker og tolkes i en datamaskin datamaskin (nærmere om risiko ved slik bruk nedenfor). Denne fisken vil ikke nødvendigvis være helt representativ for den gruppen den er plassert i grunnet implantering av en radiosender, men det vil uansett være en nyttig overvåkingsmetode av en eller flere velferdsindikatorer. Implantering av radiosender i bukhulen begrenser seg uansett til fisk over en viss størrelse. Mye av forskningen på fisk foregår på mindre individer hvor dette ikke er noen mulighet. Innføring av telemetriovervåking er også kostnadskrevenende og ikke nødvendigvis anvendbart i alle forsøkssammenhenger. Kannulering av "sentinel"-fisk er også en mulighet for skånsom blodprøvetaking uten å måtte bedøve eller håndtere fisken. Igjen begrenser denne metoden seg til fiskens størrelse.

I selve forsøkssammenhengen kan velferdindikatorer basert på atferd evalueres i forhold til hvordan fisken reagerer på daglig røkting og hvordan vannsøylen utnyttes, fiskens svømmeaktivitet og sosiale atferd som for eksempel aggresjon og hierarkidannelse. Aggressiv atferd vil også kunne observeres som hudsår og øyenapping etter biting.

Fôropptak sier også noe om fiskens velvære, og en nedsatt appetitt er ofte et varsel om at fisken er stresset eller opplever ubehag. Stress over lengre tid påvirker metabolismen og mobiliserer energilagrene i kroppen. Dette kan observeres i forholdet mellom fiskens vekt og lengde, kondisjonsfaktor, og en reduksjon i organvekt (f.eks. lever) i forhold til kroppsvekt.

Nedsatt immunrespons som følge av stress over tid kan utløse sykdomsutbrudd med bakgrunn i latent smitte eller ved eksponering for naturlig forekommende parasitter, sopp, bakterier og virus. I oppdrett behandles et sykdomsutbrudd dersom det er mulig, men i en forskningssammenheng vil det kunne være vanskelig da sykdom i seg selv kan eller bør være et endepunkt. Konklusjoner basert på en forsøksgruppe som har vært medikamentelt behandlet vil være vage om i det hele tatt valide. Her vil både det at forsøket har slått feil, og belastningene for fiskene, begrunne endepunktet.

Tabell 4.1. Forslag til indirekte velferdsindikatorer og velferdsindikatorer på individ og gruppenivå

| Indirekte | Individnivå | Gruppenivå |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------|
| Vannkvalitet | Røkteresponser | Røkteresponser |
| Oksygeninnhold | Respirasjonsfrekvens | Sosial atferd |
| Nitrogeninnhold | Respirasjonsstyrke | Fôrinntak / appetitt |
| pH | Pigmentering | Utnyttelse av vannsøylen |
| Nitritt | Kondisjonsfaktor | Aktivitetsnivå |
| Ammonium | Atferd | Helsestatus |
| | Fôrinntak / appetitt | Oksygenforbruk |
| | Utnyttelse av vannsøylen | Hormoner og metabolitter i vann |
| | Aktivitetsnivå | |
| | Hematokritt | |
| | Organvekt/fiskevekt | |
| | Helsestatus | |

4.4 Velferd og produksjonsegenskaper

I kommersielt oppdrett vurderes fiskegrupper underveis i produksjonssyklus hovedsakelig på grunnlag av tre egenskaper: Tilvekst, sykdom (helsetilstand) og dødelighet. Disse tre egenskapene bør være en selvfølgelig del av registreringene også for fisk i forsøk.

4.4.1 Tilvekst, vekstrate

I oppdrettsrelaterte forsøk er tilvekst en nøkkelfaktor. Tilvekst bedømmes gjerne på gruppebasis, gjennom registreringer av gjennomsnittsvekt. Vekst i forsøk bør beregnes ved hjelp av de samme måleenhetene som i produksjon, i hovedsak SGR og TGC. SGR (specific growth rate, prosent daglig tilvekst) påvirkes av temperaturen, mens TGC (thermal growth coefficient, VF3) tillater sammenlikning av vekstrate mellom grupper som har hatt ulike temperaturbetingelser. For de ulike artene eksisterer det tabeller over forventet tilvekst ved

ulike livsstadier og temperaturer. De estimatene som er oppgitt er gjerne noe over gjennomsnittet for tilvekst i kommersiell produksjon.

Vekstrate er et svakt punkt i mange fiskeforsøk. Det er for mange studier som viser resultater med liten eller ingen tilvekst, eller vekstrate er ikke oppgitt. Liten eller ingen tilvekst under gode temperaturforhold og med god næringstilgang er en klar indikator på suboptimale forhold for fisken, eller at fisken ikke har tilpasset seg forsøksbetingelsene.

I tillegg til gjennomsnittsvekt basert på gruppeveiing er det vanlig å individveie et visst antall individer, for å sikre et mål for størrelsesspredning i gruppa. Det er en fordel for de fleste forsøk å harmonisere individstørrelsen ved oppstart, gjennom å sortere ut de største og de minste. Stor spredning i størrelse er en indikasjon på suboptimale forhold, gjerne med hierarkidannelse.

Lengdemåling er et godt supplement til vektmålinger. Lengde må nødvendigvis måles på individbasis, og lengde/vekt-målinger på samme individ tillater beregning av kondisjonsfaktor. Lengdemålinger er mye brukt i studier relatert til ville populasjoner, og noen ganger uten at vekt er oppgitt. Med tanke på muligheten for å sammenlikne kunnskap fra ulike studier er det en fordel hvis både vekt og lengde registreres på et visst antall individ i alle typer studier.

For å oppnå gode tall for vekt og lengde er det nødvendig å håndtere og i enkelte tilfeller bedøve fisken, og fisken må ut av vannet. Selv om formålet med et forsøk tilsier hyppige registreringer må dette derfor veies opp mot faren for å påføre fisken stress og håndteringsskader.

4.4.2 Kontroll med syk og død fisk

Dødelighet er den andre nøkkelfaktoren for å vurdere status hos en fiskegruppe i kommersiell produksjon. Kontinuerlig overvåkning av forekomst av syk og død fisk er også nødvendig for å fange opp sykdomsutbrudd eller andre avvik.

I forsøkssammenheng er dette naturlig nok enda viktigere enn i kommersiell produksjon. Her må målet i tillegg være å kunne skille mellom sykdom og død som skyldes forhold utenfor forsøket, og det som skyldes behandling i forsøket. Dette tilsier en nøye overvåkning. Spesielt for liten fisk er det viktig med hyppig inspeksjon av forsøksenhetene, fordi død fisk går fort i oppløsning.

I smitteforsøk og andre forsøk som har som mål å framkalle sykdom eller død må det nødvendigvis aksepteres sykdom og død i karene. I andre forsøk er det ingen eller utilstrekkelig grunn til å vente til fisken dør. Så lenge det ikke er nødvendig for forsøksspørsmålet skal fisk med sår eller skader, eller som svimer, bli tatt ut av forsøket og avlivet. Dette følger av dyrevelferdslovgivningen, som bør konkretiseres i retningslinjer. Det bør også fremgå av retningslinjer når og i hvilken grad det er forsvarlig å ha syk eller skadet fisk i karene.

4.4.3 Helsestatus

Helseovervåking er obligatorisk for alle anlegg som har konsesjon for oppdrett av fisk. Akvakulturdriftforskriften spesifiserer kriterier for slik overvåking, og fastslår også en del krav til forbyggende tiltak, bl.a. hygieniske forhold og håndtering av syk og død fisk. Disse forskriftene dekker de fleste normalsituasjonene. Forslag til helseovervåking på fisk i forsøk er gitt i "Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research" Johansen et al., (2006) Lab Anim, 40: 323-340.

I Norge er det ingen tradisjon for SPF-besetninger (specific pathogen free) i akvakultur. I akvatisk sammenheng forutsetter dette bruk av lukkede eller strengt kontrollerte systemer. Dette er svært vanskelig å oppnå i gjennomstrømningssystemer, men er sannsynligvis mer aktuelt etter hvert som resirkuleringssystemer blir mer innarbeidet. Det er uklart hva fordelene er, og hva en forskningsmessig kan vinne på det.

4.5 Atferd som velferdsindikator

Fisk reagerer på endringer i miljøet blant annet ved å endre atferdsmønster. God og dårlig velferd blir også uttrykt i fisken sin atferd. Atferd er en egnet velferdsindikator også fordi fisken reagerer særdeles raskt på en rekke ulike stressorer. Atferden kan derfor gi et objektivt bilde på fisken sin velferd. I kommersielt oppdrett er atferd viktig i evalueringen av driften, f.eks. kan endring i atferd tilsi avvik i vannkvaliteten. Røkttere har en mengde udokumentert kunnskap om fisken sin atferd og hva som er "normalen". Denne kunnskapen bør systematiseres og dokumenteres. Særdeles viktig er bevisstheten om at atferd varierer mye mellom livsstadier, ulike arter, og at kunnskap om en oppdrettsart ikke nødvendigvis kan overføres til en annen art. Forskning på fisk i oppdrett foregår i kar, både innendørs og utendørs, og i merd, og de fleste atferdsvariablene kan studeres i begge element, men med noen unntak.

Atferden til laks og torsk er til dels nøye studert i merd. Hos torsk er atferden spesielt interessant i forbindelse med fare for rømming, og i forbindelse med laksoppdrett har plassering i merd og vertikale vandringer vært et tema.

Videre utvikling av metoder for overvåking av velferd i kar bør være av høy prioritet, ettersom miljøet i et kar er manipulerbart og endringer i vannkvaliteten kan få dramatiske konsekvenser. Ofte kan observasjoner av fiskens atferd være utslagsgivende for at avvik i driften av forskningsenheten i det hele tatt blir oppdaget. Derfor bør det settes stor prioritet i å definere gode atferds-indikatorer for fisk i kar. Videre er det viktig å definere indikatorer som kan brukes på gruppenivå ettersom atferden til enkeltfisk ofte ikke samsvarer med atferdsmønsteret til fisk i gruppe. Atferdsvariable som kan egne seg for studier av velferd i kar er svømmeaktivitet og svømmemønster, vertikal og horisontal plassering, "sturing", gjellelokkbevegelser, aggresjon og sosiale interaksjoner, og appetitt. Preferanser og tilsvarende unngåelse er høyst aktuelt å studere, selv om slike studier må gjøres på enkeltfisk. I forsøk kan atferden filmes med video; enten ovenfra karet eller med undervannskamera. Det er også mulig å merke enkeltfisk for enklere måling på individnivå. I den følgende beskrivelsen av enkelte atferdsindikatorer vil atferd i kar være hovedfokus.

4.5.1 Svømmeatferd

Svømmeatferd omhandler plassering i kar, tid brukt til svømming, snubevegelser, halefinnefrekvens, svømmemønster og fluktrespons. Fiskens sitt fordelingsmønster i karet kan gi informasjon om vannkvaliteten. Under optimale forhold står fisken oftest samlet i karet, mens økt spredning kan f.eks. tyde på dårlige oksygenforhold. Lakseparr beveger seg tilsynelatende lite i kar, ettersom de står motstrøms. Dersom strømmen er sterk kan de drive noe bakover, men prøver å unngå dette. Svømmemønsteret gir derfor informasjon om fiskens kondisjon ettersom en fisk i dårlig kondisjon ikke vil være i stand til å stå motstrøms, men vil svirre rundt med vannstrømmen. Tid brukt til svømming og snubevegelser vil tilsvarende være et tegn på vannstrømmen og kondisjonen til fiskene. I helt stillestående vann vil svømmingen være aktiv og usynkronisert. Dersom fisken er under stress vil den svømme mye og kaotisk, selv om strømmen er optimal. Fluktrespons er også vanlig å observere dersom gassnivåene i vannet er suboptimale. Gjellelokkbevegelser er en adekvat indikator på kondisjonen, men kan være vanskelig å observere på enkeltfisk ettersom man da må komme veldig nær fisken for å observere dette. Hull i karveggen kan være en løsning, men også dette kan stresser fisken.

Synlige og negative atferdsvariable i merd er bl.a. luftsnapping, lateralsider opp og finner i overflaten, Disse er som oftest relateres til økt tetthet og stress under trenging og er sterkt negative velferdsindikatorer man ikke ønsker å observere i forsøk. Svømmetid er også en aktuell indikator i merd.

4.5.2 Aggresjon og sosiale interaksjoner

Fisk er ofte territorielle dyr, og vill laks danner dominanshierarkier. I kar med liten tetthet vil dannelsen av dominanshierarkier stresser fisken helt til disse er etablert. I kommersiell drift med sortering og oppriving av hierarkiene vil stadig dannelse av nye hierarkier stresser fisken voldsomt. Dersom tettheten holdes høy vil individene i karet ikke være i stand til å danne hierarkier ettersom det er for mange individer å forholde seg til, men tettheten må ikke overskride den grensen som gir dårlig velferd for fisken. Aggresjon og hierarkier i småskala er tidligere studert. Dersom fôrmengde og – fordeling og vannstrøm er optimal, vil aggresjon sjelden være et problem. Men økt aggresjon er ofte et tegn på at fôring er suboptimal og/eller at vannstrømmen er for liten. Indikatorer på aggresjon kan være jaging og biting. Fisk med skadde finner og sårskader kan ha vært utsatt for aggresjon. Men aggresjon i kar gir seg ofte uttrykk i posisjonering heller enn fysisk biting, ettersom fisk, som andre dyr, prøver å unngå risikoen for fysiske skader. Posisjonering må observeres, f.eks. gjennom videoopptak. Parr står oftest i ro mot strømmen, med sin faste plass. Dersom en annen fisk kommer til denne lokaliteten vil "innehaveren" dytte den vekk, men uten fysisk skade.

4.5.3 Appetitt

Fiskens sin appetitt er et godt tegn på velferd, og det er et velkjent faktum at fisk, etter flytting eller annen betydelig håndtering og endring i miljø, ikke spiser på noen dager. Faktorer som kan hemme fiskens sin appetitt er sykdom, endring i miljø, suboptimalt miljø og generell mistriivsel. Appetitt kan bl.a. måles gjennom observasjon av fôrintak og ved hjelp av fôroppsamlere (fvc).

Oppsummering av (observerbare) atferdsindikatorer for fisk

- plassering i kar
- tid brukt til svømming
- snubevegelser
- halefinnefrekvens
- svømmemønster
- jaging
- biting
- finne- og sår skader
- posisjonering
- fluktnespons
- appetitt (fôrintak)
- gjellelokkbevegelser (pusterate)
- luftsnapping (merd)
- lateral sider opp (merd)
- finner i overflaten (merd)

4.6 Morfologiske velferdsindikatorer

Vurdering av morfologi forutsetter systematiske observasjoner som bygger på kunnskap om den aktuelle arten og hvilket livsstadium fisken er på. En eller annen form for morfologisk vurdering inngår i svært mange studier, og faktorer som for eksempel finneslitasje har vært langt framme i diskusjonene om velferdsindikatorer for fisk. Men for mange av de ytre egenskapene gjelder det at dokumentasjonen av sammenhengen med fiskens helse og velferd er relativt svak. Samtidig er det potensielt mye informasjon å hente, og det er en hovedutfordring å komme nærmere objektive kriterier på dette området, både når det gjelder hvordan disse egenskapene skal bedømmes og vurderes, og hvilken betydning de har for fiskens helse og trivsel.

4.6.1 Kroppsform, kondisjonsfaktor

Den vanligste måten å vurdere kroppsform på er kondisjonsfaktor. Kondisjonsfaktor bestemmes etter en formel som beskriver forholdet mellom vekt og lengde, der høyere kondisjonsfaktor betyr høyere vekt i forhold til lengde. Denne parameteren er mest brukt hos laksefisk, men er under introduksjon også hos noen av de andre artene.

Høy kondisjonsfaktor kan bety at fisken er i godt hold, men kan også bety at ryggraden er forkortet pga misdannelser. Det finnes mange publiserte verdier for kondisjonsfaktor for ulike arter, men ikke anerkjente referanseverdier. Ved sammenlikning av forsøk med laksesmolt fra 15-20 år tilbake ser vi også at det har skjedd en drift i verdier, ved at dagens parr og smolt både er større ved en gitt alder og har høyere kondisjonsfaktor ved en gitt størrelse. Sammenlikning med studier av villfisk viser det samme. Oppdrettsfisk er større og i mye bedre hold enn villfisk av sammenliknbar alder og størrelse.

Det er vanskelig å bruke kondisjonsfaktor som et objektivt mål for velferd, og det er ikke mulig å si at høyere eller lavere kondisjonsfaktor er negativt for fisken, annet enn i ekstreme

tilfeller. Samtidig er denne faktoren godt innarbeidet og lett å registrere, og kan utvilsomt gi verdifulle indikasjoner på fiskens status. Dette gjelder spesielt ved sammenlikning av kondisjonsfaktor mellom grupper i et forsøk. Variasjon i kondisjonsfaktor blant individene i en gruppe, for eksempel som CV (variasjonskoeffisient), er bl.a. relevant i forbindelse med ernærings- og andre oppdrettsrelaterte studier. Det forventes en større variasjon i CV når betingelsene for fiskegruppa er suboptimale, og det skapes noen vinnere og noen tapere.

4.6.2 Morfometriske studier av kroppsform

Ved hjelp av avanserte bildeanalyseverktøy kan kroppsform beskrives matematisk. Slike metoder er under utvikling bl.a. for havabbor. Analysemetodene bygger på bilder tatt under harmoniserte forhold. Det plasseres markører ved gitte anatomiske strukturer, og avstand og plassering av punktene i forhold til hverandre brukes til å beskrive individets morfologi.

Slike metoder er ikke utviklet for de norske artene. De er foreløpig svært arbeidskrevende, men kan i teorien automatiseres derom en lykkes med å videreutvikle dem. Det er likevel langt fram, og med dagens status for disse metodene forteller de ikke så mye mer enn det et trent øye kan oppnå på en brøkdel av tiden.

4.6.3 Misdannelser og deformiteter, asymmetri

Normal utvikling er en positiv velferdsindikator, som tilsier at fiskens grunnleggende behov er dekket. Misdannelser og deformiteter er beskrevet som et problem hos alle de artene som er aktuelle som forsøksfisk i Norge. Forskingen omkring årsaker til misdannelser hos oppdrettsfisk har kommet langt i å redusere problemene i kommersiell produksjon, selv om det gjenstår mange uløste spørsmål. I dagens situasjon kan det likevel forventes at de fleste fiskepopulasjoner som er aktuelle som forsøksdyr har et visst innslag av misdannelser, og at dette kan variere på et slikt nivå at det kan ha betydning for kvaliteten på et forsøk. Forekomsten av fisk med misdannelser bør derfor registreres og beskrives.

Av kjente årsaker til misdannelser er temperaturforhold i ulike deler av oppdrettet og mangelfull mineralisering av skjelettet de som er best beskrevet. Temperaturforholdene er spesielt viktig på embryostadiet og under tidlig yngelfase. Samtidig eksisterer det studier som viser sammenheng mellom maternalt stress og forekomst av ytre asymmetri, for eksempel feilplassering av finner. Spesielt for misdannelser som induseres på embryostadiet er det viktig å vite at disse gjerne opptrer i ulike kombinasjoner i en og samme fiskegruppe, og at både ytre og indre misdannelser kan ha felles årsak.

Registrering av ytre misdannelser og asymmetri bør settes i system, og gjerne kombineres med registrering av for eksempel finnestatus, katarakt og sår. Registreringene må omfatte vurdering av kroppsform, med lokalisering av eventuelle avvik eller synlige deformiteter. Avvik i hode- eller kjeveform, misdannede gjellelokk, misdannede finner, avvik i størrelse og form på øyer er aktuelle sjekkpunkt. For å fange opp asymmetri må plassering av ytre kjennetegn i forhold til midtlinja bedømmes.

I grupper der det registreres høye nivå av misdannelser kan det være påkrevet å supplere undersøkelsene med røntgen for å få et riktig bilde av forekomsten. Det er også viktig å

erkjenne at misdannelser over en viss alvorlighetsgrad vil bety noe for fiskens vekst og utvikling, og at dette er faktorer som kan påvirke kvaliteten av forsøksdata. Det er derfor ikke riktig å bruke slike fiskegrupper i forsøk.

I regi av prosjektet "Fine Fish" (Improving sustainability of European fish aquaculture by control of malformations) er det under utarbeidelse retningslinjer for klassifisering av misdannelser hos noen arter, bl.a. laks, regnbueørret og torsk. Disse retningslinjene lages først og fremst for bruk i praktisk oppdrett. Det bør vurderes om disse retningslinjene skal utvides til et detaljeringsnivå som tilfredsstillende behøver i vitenskapelige studier, og eventuelt utvides med flere arter.

4.6.4 Finneslitasje

Finnestatus har vært mye framhevet som en aktuell velferdsindikator, og i de siste årene er det lagt ned mye arbeid i å registrere finneslitasje i ulike forsøkssammenhenger. Det eksisterer noe dokumentasjon som bl.a. viser sammenheng mellom finneslitasje over et visst nivå og redusert tilvekst, men samtidig finnes både forsøksdata og ikke minst praktiske erfaringer som indikerer at finneslitasje like gjerne kan være resultat av en relativt kortvarig periode med underfôring, som ikke påvirker fiskens vekst og utvikling i særlig grad.

Ved bedømmelse av finneslitasje er ulike former for scoring mye brukt. Alternativt arbeides det med å utarbeide mer objektive mål, ved hjelp av målinger og/eller bildeanalyse. Det finnes ikke noe standard opplegg for slike registreringer, noe som vanskeliggjør utnyttelse av data på tvers av studier. Det er også kjent at villfisk har mer velutviklede finner enn fisk som er vokst opp under oppdrettsbetingelser.

4.6.5 Katarakt

Katarakt observeres hyppig hos forsøksfisk, erfaringsmessig i langt større grad enn hos produksjonsfisk. Det er imidlertid ikke så vanlig å registrere det, unntatt i forsøk der katarakt inngår som del av formålet med studien. Katarakt er sannsynligvis en god indikator på den belastning fisken utsettes for i forsøk. Det er også sannsynlig at forekomst og grad av katarakt har innvirkning på fiskens vekst og velferd. Det er derfor behov for å kartlegge forekomsten, og identifisere årsaker til utvikling av katarakt og tiltak knyttet til fiskens spesielle rolle som forsøksdyr.

Registreringer av katarakt i studier der dette inngår som del av forsøksspørsmålet er relativt spesialiserte undersøkelser, som krever spesialkompetanse og eget utstyr. Det finnes imidlertid også metoder for visuell vurdering av katarakt under produksjonsforhold. Slike registreringer gir mindre informasjon enn de mer spesialiserte metodene, men er tilgjengelige mye enklere å gjennomføre. Med tanke på å kartlegge omfang av katarakt i forsøksfiskpopulasjoner er dette sannsynligvis gode nok metoder.

4.6.6 Bedømmelse av hud, slimlag og skjellkledning

Det forventes større belastninger på hud, slimlag og skjellkledning på grunn av håndtering og berøring hos forsøksfisk enn det som er normalt i en oppdrettssituasjon. I tillegg til mekanisk

belastning er det sannsynligvis en påkjenning for hud og slimlag å bli eksponert for luft for eksempel i forbindelse med registreringer og prøveuttak. Det finnes i liten grad standardiserte metoder for å karakterisere eller kvantifisere status på hud og slimlag, eller skjelltap.

Utvendig slim har vært undersøkt kvalitativt i et visst omfang i forbindelse med immunologiske studier. Det er godt grunnlag for å hevde at analyser av faktorer i slimlaget kan brukes til å beskrive fiskens immunkompetanse, og settes også i forbindelse med evne til å motstå lakselusangrep. Det registreres også variasjon i mengde og viskositet av slimlaget, uten at det eksisterer metoder for å beskrive dette presist eller kunnskap om hva det har å si for fiskens ve og vel.

I sammenheng med hud og skjellkledning er det først og fremst tap av hudlagets integritet som er av interesse. Spesielt i forbindelse med håndtering er det fare for å påføre fisken sår og skrammer, eller å forårsake skjelltap. Hos laks i forsøk er dette et typisk problem rundt smoltifisering, der en gjerne gjør registreringer i forbindelse med utsett i sjø, når skjellene sitter løst og væskebalansen samtidig er på det mest sårbare, men problemet er aktuelt for forsøksfisk uansett stadium. Skjelltap registreres noen ganger systematisk, og da gjerne i form av et scoringssystem. Med utvikling av bildeanalyseteknikker burde det være mulig å komme fram til objektive målemetoder for å kvantifisere skjelltap, slik at dette kan brukes mer systematisk i en vitenskapelig sammenheng.

4.6.7 Andre morfologiske velferdsindikatorer

- Farge/pigmentering og endringer i farge/pigmentering.
- Organindekser (relativ størrelse av organer som f.eks. lever, milt vs. kroppsstørrelse).

4.7 Indre (fysiologiske) velferdsindikatorer for fisk i forsøk

En ulempe ved måling av indre velferdsindikatorer er at dette som regel forutsetter bedøvelse og prøvetaking av et utvalg fisk og vil således utgjøre en direkte påvirkning på de målte fisk (samt påvirke resterende fisk i gruppen ved f.eks. håving fra en større gruppe). På den annen side muliggjør håndtering og prøvetaking målinger av langt flere velferdsindikatorer. For mange slike indikatorer vil det være tilstrekkelig med en rask og liten prøvemengde slik at fiskene kan returneres tilbake i gruppen (og eventuelt gjennomgå ny prøvetaking på et senere tidspunkt; seriesampling), men for andre parametre vil prøvetakingen måtte innebære avlivning (terminal prøvetaking). Eksempler på ikke-terminale prøvetakinger er mindre prøver av slim for immunologiske målinger, biopsi av finne for DNA/RNA-analyser, gjellevev for Na^+/K^+ -ATPase aktivitet som indikator på smoltifisering og sjøvannstoleranse hos laksefisk, eller blodprøve for måling av hormoner, metabolitter og andre parametre i blod, serum eller plasma, røntgenbildetaking for måling av skjelettdeformiteter eller fôrintak. Eksempler på terminale samlinger kan være prøvetaking av lever eller muskelvev for måling av f.eks. heat shock proteiner eller energilagre

De mest brukte indre velferdsindikatorer for fisk er måleparametre som relateres til akutte stressreaksjoner eller til endret helsetilstand. Slike måleparametre kan være på molekylært,

cellulært, vevs/organnivå eller organismenivå. For målinger på molekylært og cellulært nivå vil valg av relevant velferdsindikator i stor grad avhenge av gitt eksperimentelle design, mens velferdsindikatorer på organismenivå har en mer generell anvendelse. Selv om fiskenes stressrespons i utgangspunktet er en adaptiv prosess og der kronisk stress heller enn akutt stress anses som mest relevant, er det slik at vedvarende og/eller gjentatt aktivering av akutte stressresponser over tid vil kunne gi maladaptive responser assosiert med kronisk stress. Dersom stressoren(e) er kraftige er det i tillegg slik at den akutte stressresponsen kan være utilstrekkelig. Dette vil medføre umiddelbart redusert velferd i form av å true fiskens fysiologiske likevekter.

4.8 Molekylære og biokjemiske markører

Mulige molekylære og biokjemiske velferdsindikatorer kan innebære alt fra måling av transkripsjonsfaktorer, heat shock proteiner (HSPs) og enzymaktiviteter, til metabolitter og endringer i energilagere. Noen av de mest brukte innen forsøksfisk er: HSPs, blodverdier av laktat, glukose, hematokrit, endringer i osmolalitet og elektrolyttnivåer, pH og blodgassnivåer, endring av cellulært RNA/DNA forholdstall.

4.8.1 Neuroendokrine og immunologiske markører

Blant de neuroendokrine markørene inngår endret aktivitet i det autonome nervesystem og utskillelse av hormonene adrenalin og noradrenalin, aktivering av hypothalamus-hypofyse-interrenalaksen og utskillelsen av hormonene adrenokortikotrop hormon (ACTH) og kortisol, samt indirekte gjennom måling av molekylære og biokjemiske responser knyttet til disse prosessene (j.f. ovenfor). Av immunologiske parametre har immuncellenivåer i blod vært mye brukt, mens det nå er en rekke andre parametre som også evalueres.

4.8.2 Integreerte kroppsfunksjoner og telemetri

Målinger av velferdsindikatorer som representerer integreerte kroppsfunksjoner (e.g. respirasjon, kardiovaskulære prosesser, fôrdøyelsen) gjenspeiler hele organismens homeostaseregulering og er som regel mer robuste og har en mer generell anvendelse enn f.eks. molekylære og biokjemiske markører. Molekylære og biokjemiske målinger på bedøvet eller avlivet fisk vil oftest ha liten verdi og forutsetter bruk av kannulert fisk (for blodparametre) eller bruk av fysiologisk telemetri for måling av f.eks. respirasjonsparametre eller hjertefrekvens (refs). Telemetri utgjør således et kontinuerlig velferdsmål (i motsetning til enkeltprøvetaking) som i tillegg regnes for i stor grad å være nøytral (ikke påvirke fiskens biologi i vesentlig grad) så sant telemetri-merket er festet på hensiktsmessig vis under bedøvelse, ikke er for stort, og fisken får tid til å rekonvalesere etter instrumenteringen.

4.9 Forskningsbehov

4.9.1 Generelle forskningsbehov

- Grunnleggende kunnskap om variasjon i de mest brukte velferdsindikatorerne i forhold til art, kjønn, livsstadie, årstid og miljø (herunder temperatur).
- Eksperimentell validering av de mest brukte velferdsindikatorernes relevante anvendelsesområde (styrker og feilkilder i forhold til ulike typer eksperimentell behandling).
- Etablere parametere for velferdsscore.
- Bruk av "sentinel" fisk / velferdsmonitorer.
- Etablering av en kunnskapsdatabase for "normalverdier" (og unormale).
- Atferd som indikator for velferd hos fisk i kar.
- Identifisere og validere indirekte velferdsindikatorer.

4.9.2 Produksjonsegenskaper og helsestatus

- Utarbeide standardiserte metoder for å oppgi vekstrate i forsøk.
- Utarbeide tabeller over forventet tilvekst under ulike temperaturer for de artene der dette mangler.
- Utarbeide kriterier for dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkter for syk eller skadet fisk, for ulike arter og utviklingsstadier.

4.9.3 Atferd som velferdsindikator

- For å øke kunnskapen om velferd hos fisk både i oppdretts- og forsøkssammenheng, er det et stort behov å studere fisk sitt atferdsmønster i gruppe.
- Det er et stort behov for å definere gode atferdsindikatorer for fisk i kar og merd, og at disse relateres til velferd. Det er behov for å definere grenseverdier for god og dårlig velferd ved å relatere atferd med fysiologi og morfologi.
- Det er et stort behov for å kartlegge atferdsmønster hos ulike arter og øke bevisstheten om variasjon mellom ulike arter.
- Det er behov for å studere fisken sin evne til å mestre stress og utfordringer i ulike miljø.
- Identifisere og validere indikatorer for positiv velferd.

4.9.4 Ytre velferdsindikatorer

- Systematisere og utvikle kunnskap om metoder for å vurdere kroppsform hos ulike arter. Foreslå grenseverdier for normal kroppsform for fisk i ulike livssituasjoner og miljøer.
- Utvikle standardiserte metoder for å bedømme normal versus unormal utvikling og asymmetri, og for å klassifisere deformiteter og misdannelser i forhold til velferd.
- Videreutvikle finneslitasje som velferdsindikator, med tanke på standardiserte målemetoder og bedre kunnskap om sammenhengen mellom finneslitasje og fiskens velferd. Hva med slitasje på snuten?

- Kartlegge forekomsten av katarakt hos forsøksfisk, med tanke på å avdekke om, og eventuelt hvorfor, dette er et relativt sett mer omfattende eller mindre problem i forsøk enn i kommersielt oppdrett. Samt identifisere tiltak for å forebygge katarakt, i forsøkssammenheng.
- Utvikle bedre metoder for å kvantifisere og karakterisere det ytre slimlaget, og arbeide fram kunnskap om sammenhengen mellom slimlagets status og fiskens velferdsstatus, herunder vurdering av risiko.
- Utarbeide metoder for å kvantifisere skjelltap ved hjelp av bildeanalyse.

4.9.5 Indre velferdsindikatorer

- Forståelse av relevante indikatorers variasjon i forhold til naturlige reguleringsprosesser som ikke nødvendigvis indikerer en endret velferdsstatus.
- Utvikling av validerte prosedyrer for telemetrisk instrumentering og etterfølgende restituering som sikrer forsvarlig velferd (bl.a. gjennom kvantifisering av merkenes egen innvirkning på fiskenes velferd).
- Dokumentasjon og videreutvikling av teknologien for telemetriske velferdsindikatorer.
- Utvikle validerte metoder for måling av indre parametre i fiskens ytre miljø og kunnskap om sammenhengen med fiskenes velferdsstatus. For eksempel enkel og rask metode for måling av kortisolnivåer i utløpsvann.
- Validere håndholdte målere for nær instantan måling av fysiologiske parametre (f.eks. I-STAT, glukose- og laktatmålere).
- Konjugert glukose og andre mulige mål for langtidsendring av ernæringsmessig status og eventuell feilernæring.

4.10 Referanser

Damsgard, B., Arnesen, A.M., Baardvik, B.M., Jobling, M. (1997). State-dependent feed acquisition among two strains of hatchery-reared Arctic charr. *Journal of Fish Biology* 50, 859 - 869

Eriksen, Marit Skog (2006). Embryonic exposure to glucocorticoids and its impact on developmental trajectories: with particular emphasis on farmed Atlantic salmon (*Salmosalar*) Doktorgradsavhandling, Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås, ISBN 82-575-0711-3.

Espmark, Å. (2004). Behavioural and physiological indicators of stress during crowding in Atlantic salmon – and effects on rigor mortis. AKVAFORSK rapport nr. 34/04.

Espmark, Å., Baevefjord, G. (In Press). Effects of hyperoxia on behavioural and physiological variables in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquaculture International* (doi: 10.1007/s10499-008-9206-6)

Juell, J.E., Oppedal, F., Boxapen, K., Taranger, G.L. (2003). Submerged light increases swimming depth and reduces fish density of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in production cages. *Aquaculture Research* 34, 469 – 477.

Moe, H., Dempster, T., Sunde, L.M., Winther, U., Fredheim, A. (2007). Technological solutions and operational measures to prevent escape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fro sea cages. *Aquaculture Research* 38, 91-99.

Oppedal, F., Juell, J.E., Taranger, G.L., Hansen, T (2001). Artificial light and season affect vertical distribution and swimming behaviour of post-smolt Atlantic salmon in sea cages. *Journal of Fish Biology* 58, 1570 – 1584.

Forskningsbehov innen dyrevelferd i Norge (NFR 2005)

Dyrevelferd i akvatisk dyrehold – herunder fremtidens dyrehold (NIVA 2007)

5 Smerte, stress og smertevoldende prosedyrer og dyrevelferdsmessige endepunkter hos fisk

Elisabet Forsgren, Øyvind Aas-Hansen og Trond Brattelid

5.1 Smertereaksjon hos fisk

Smerte kan defineres som en ubehagelig sensorisk og emosjonell erfaring assosiert med en faktisk eller potensiell vevsskade. Man skiller mellom aktivitet i reseptorer og nervebaner (nosiseptorer og nosisepsjon) som registrerer potensiell vevsskade (dvs. sanseopplevelsen) og den følelsesmessige oppfattelsen av dette som ubehagelig (dvs. smerteopplevelsen). Nosiseptorer reagerer på mekanisk trykk, ekstreme temperaturer og kjemikalier og er påvist i en rekke dyrearter fra flatormer til mennesker. Aktivitet i nosiseptorer og nosisepsjon kan sette i gang fysiologiske og atferdsmessige autonome (refleksive) responser, men forutsetter at organismen har utviklet en form for forståelse eller bevissthet for også å kunne gi opphav til smerte. Det å påvise smerte hos dyr er grunnleggende vanskelig da emosjoner og bevissthet ikke er lett å evaluere, og selv komplekse atferdsresponser kan skyldes serier av reflekser.

Smerte er en ubehagelig sensorisk og emosjonell erfaring assosiert med en faktisk og potensiell vevsskade, eller en forventning om en slik skade.

Spørsmålet om fisk opplever smerte er kontroversielt. Noen mener at fisk kun har evnen til nosisepsjon og ikke kan oppleve smerte og lidelse blant annet fordi de mangler de områdene i hjernen (blant annet neocortex) som er knyttet til smerteopplevelse hos pattedyr. Reaksjoner på potensielt smertevoldende stimuli hos fisk hevdes derfor å være reflektoriske og sammenliknbart med det man finner hos mennesker med skadet prefrontal hjernebark.

Kriterier som ofte brukes for å si om dyr skal kunne være bevisst smerte:

- Reseptorer (nociseptorer), som er sensitive til skadelige stimuli, strategisk plassert på eller i kroppen.
- Nervebaner som kopler nosiseptorer til høyere hjernesentere.
- Hjernen har strukturer analoge til menneskets cerebral cortex (hjernebark)
- Reseptorer i det sentrale nervesystemet, spesielt hjernen, som aktiveres av opoide substanser involvert i smertekontroll.
- Smertestillende midler, som forandrer responsen på skadelige stimuli, velges av et dyr som har tilgang til dette når slike stimuli ikke kan unngås.
- Dyret responderer på skadelige stimuli ved å unngå dem eller ved å redusere skaden som påføres kroppen.
- Reaksjonen på en gitt skadelig stimulus er stort sett den samme hver gang. Responsen forandres ikke, uavhengig av hvor stor belønningen er for en gitt atferd.
- Dyret lærer å kople nøytrale hendelser med smertefulle stimuli.

Fisk i forsøk plasseres i en situasjon hvor de utsettes for utfordringer som ikke er naturlige utfra deres evolusjonære historie. Smerterespons er en sammensatt atferds og fysiologisk

respons på en ubehagelig og stressende situasjon. For å overvåke fisken velferd, derunder opplevelse av smerte, i forsøk observeres fisken hovedsakelig på atferd isolert uten hensyn til at dette er en del i en kompleks respons.

Det er dokumentasjon på at fisk oppfyller flere av kriteriene som må være oppfylt for at dyr kan ha mulighet til å føle smerte:

- Man har påvist at fisk har både nosiseptorer og nerver for å lede informasjonen videre til hjernen.
- Enkelte studier viser også at dette kan involvere såkalt høyere hjernedeler, som tross anatomiske forskjeller ikke kan utelukkes å være analoge til tilsvarende hjernestrukturer hos pattedyr.
- Fisk har, i likhet med en rekke invertebrater og vertebrater, også endogene opioider og opioidreseptorer, som man vet er involvert i å redusere smerte hos pattedyr.
- Atferdsstudier har påvist utviklede kognitive egenskaper og atferdsrespons til potensielt smertefull stimulering som ikke karakteriseres som reflektoriske men som tyder på mulighet for smerteopplevelse.
- En annen indikator for om ett dyr opplever smerte er hvis smertestillende middel endrer den nosiseptive responsen. Studier har vist endret atferdsrespons til potensielt smertefulle stimuli hos bl.a. gullfisk og ørret som ble gitt morfin (vist gjennom en mer normal atferd og respirasjonsrate). Dette er imidlertid også vist hos f.eks. metemerk og snegler som i dag, ut fra en sansynlighetsvurdering, ikke anses å kunne oppfatte smerte.

De fleste av disse kriteriene er imidlertid kriterier for nosisepsjon som således er en forutsetning for mulig smerteoppfattelse. Det bør imidlertid nevnes at fisk har 400 millioner år med separat evolusjonshistorie, og man kan derfor ikke utelukke muligheten for at de kan ha utviklet andre områder av hjernen analoge til de som er involvert i human smerteoppfattelse.

På denne bakgrunn og ut i fra et "føre - var prinsipp" vil en riktig arbeidshypotese være at fisk kan oppfatte smertefulle stimuli, og dermed oppleve negative følelser og tilstander forbundet med smerte.

5.1.1 Prosedyrer og rutiner forbundet med smerte

Blant prosedyrer i fiskeforsøk som kan være forbundet med smerteopplevelse kan nevnes sykdomsforsk, fangst (f.eks. elektrofiske), finneklipping, ulike typer av merking, kirurgiske inngrep, håndtering og avliving.

5.2 Stressrespons hos fisk

Stress er en tilstand som følge av fysisk eller psykisk påvirkning som karakteriseres av at organismens vitale likevekter utfordres.

Fiskenes velferd er grunnleggende avhengig av å opprettholde et stabilt indre miljø (fysiologiske likevekter - homeostasen) og å unngå vevsskade eller predasjon. I forsøkssammenheng har fisk som regel begrenset mulighet til atferdsmessig å unngå ugunstige endringer eller trusler i deres gitte ytre miljø og er derfor i stor grad avhengig av deres nedarvede og individuelle evne til å håndtere slike utfordringer. Fisken vil ofte kunne tilpasse seg mindre og gradvise endringer over tid gjennom at fiskene akklimeres. Derimot vil ofte raskere endringer eller utfordringer (såkalte stressorer) sette igang en kaskade av mekanismer som med en fellesbenevnelse kalles for fiskens stressreaksjon. Stressrespons kan deles i to hovedtyper: akutt og kronisk. Akutt stressrespons viser til fiskens sett av responser som trer i kraft som følge av et isolert tilfelle av stress, mens kronisk stressrespons viser til hvordan de akutte responsene endres og eventuelt nye responser initieres som følge av vedvarende eller gjentatte tilfeller der stressresponsen aktiveres (Figur 5.1). Mens den akutte stressresponsen er forbigående og anses som adaptiv for å håndtere en gitt utfordring, vil vedvarende eller gjentatt aktivering av stressrespons (ved kronisk stress) medføre at maladaptive sideeffekter bygges opp. Dette i tillegg til de i utgangspunktet adaptive responsene til selve utfordringen (Figur 7.1).

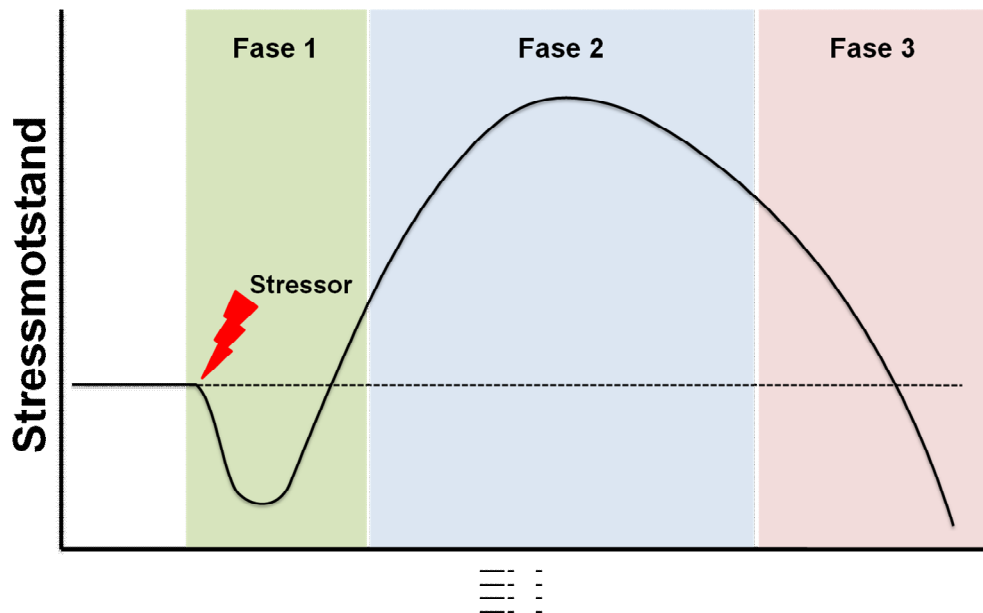
Primær respons - aktivering og sekresjon av hormoner, bl.a. katekolaminer (adrenalin, noradrenalin) og kortikosteroider (kortisol) til blodet.

Sekundær respons – økt nivå av stresshormoner utløser bl.a. frisetting av glukose til energiproduksjon med påfølgende økning i hjerterate, gjennomblødning av gjeller, økt metabolisme med påfølgende økt laktatnivå og hematokritt.

Tertiær respons - når endringer i blodets og vevenes fysiologi leder til store endringer i organismens ytelse, med endret atferd og redusert vekst rate, sykdomsmotstand, og overlevelse.

I forsøkssammenheng vil ikke-planlagt akutt stress kunne være en alvorlig feilkilde men anses normalt ikke for å være et velferdsproblem såfremt graden av stress er innenfor håndterbare rammer (dvs fiskens akutte stress respons er tilstrekkelig for å opprettholde/gjenopprette fiskens fysiologiske likevekter). Gjentatt eller vedvarende stress, på den annen side, vil kunne utvikle seg til et signifikant velferdsproblem, og i tillegg utgjøre en betydelig feilkilde. Følgelig anses kronisk stress som mest relevant i vurderingen av forsøksfiskenes velferd, men forståelsen av denne forutsetter inngående kunnskap om forsøksfiskens akutte stressrespons. Stressrespons kan også aktiveres for å opprettholde homeostasen i forbindelse med det som kan anses som positive utfordringer som ikke assosieres med dårlig velferd. Likeledes kan f.eks. reproduksjonsatferd totalt endre hva som defineres som god velferd. For eksempel innebærer stillehavslaksenes naturlige gytevandring det som kan karakteriseres som en programmert kronisk stress-situasjon som

ender med homeostasens fullstendige kollaps like etter gyting, uten at dette nødvendigvis bør karakteriseres som dårlig velferd.



Figur 5.1. Stressmotstanden endrer seg i ulike faser ved stresseksponering over tid.

Fase 1 - Alarmering og akutt stress, stressoren identifiseres eller realiseres og sammenfaller med frisetting av adrenalin og aktivering hypotalamus-hypofyse-interrenalaksen (fight or flight). Fase 2 - Motstand og vedvarende stress - organismen mobiliserer ved vedvarende stress og prøver å tilpasse seg stressbelastningen. Over tid vil resursene tilgjengelig for å motstå stressor gradvis avta. Fase 3 – Utmattelse og kronisk stress - kroppen er ikke lenger i stand til å motstå stresseksponeringen og opprettholde normal funksjon. Vedvarer denne tilstanden vil organismen etter hvert oppleve dekompensasjon med blant annet nedsatt immunforsvar, økt hjerterate, fordøyelsesproblem og kardiovaskulære problem.

5.2.1 Akutt stress

I grove trekk er generell respons til akutt stress relativt godt beskrevet for flere arter fisk og skiller seg i prinsippet lite fra andre vertebrater inklusive mennesker. Den generelle stressresponsen kan oppsummeres med en primær respons hvor en eller flere stressorer utløser frigjøringen av såkalte stresshormoner ut i blodbanen. Disse signalstoffene virker så via spesifikke reseptorer som igangsetter respektive biokjemiske og fysiologiske endringer, de sekundære stressresponsene, som normalt sett opprettholder fiskens kroppslige likevekter (eller gjenoppretter en ny, midlertidig likevektstilstand) gjennom kompensatorisk endring av regulerte kroppsparmetre. Dette vil i sin tur gå på bekostning av andre, midlertidig nedprioriterte kroppsfunksjoner og gi såkalte tertiære stressresponser (bieffekter på organismenivå, f.eks. effekter på fordøyelse, reproduksjon, immunologi). Slike tertiære responser anses imidlertid sjelden å utgjøre et velferdsproblem ved akutt stress, da den korte varigheten normalt sett knapt gir målbare endringer på dette nivået. Dersom stressor er særdeles kraftig kan det skje at fiskens akutte stressresponser ikke er tilstrekkelige for opprettholdelse av fiskens vitale likevekter. Dette vil medføre en patologisk tilstand kjennetegnet ved bl.a. utmattelse, likevektsproblemer og i verste fall død, og således utgjøre et svært alvorlig velferdsproblem.

5.2.2 Kronisk stress

Ved kronisk stress vil som regel flere av de karakteristiske endringene som kjennetegner den akutte stressresponsen falle tilbake til nær-normale verdier og således være vanskeligere å detektere. Den stress-induserte homeostasen er da gjerne modulert gjennom endringer på nivåer som likefullt er en del av akutt-stress repertoaret, men som involverer langtidsreguleringen snarere enn korttidsreguleringen. En slik fullstendig omrokking av den primære akuttstress-reguleringen kan innebære adaptive endringer i alt fra hormonsekresjon og -metabolisering, regulering av hormonenes bindingsproteiner, samt av reseptorkonsentrasjon, -affinitet og evt. -distribusjon. Samtidig vil den lengre varigheten av de kompensatoriske endringene medføre at ugunstige tertiære responser kommer mer og mer til uttrykk, inntil disse i seg selv truer fiskens homeostase og dermed utgjør et betydelig velferdsproblem som kan kompromittere forsøksfiskens liv og helse. Utskredne stadier av kronisk stress kan således ofte identifiseres ved blant annet endringer fra normal atferd, redusert vekst og sykdomsutbrudd.

5.2.3 Prosedyrer og rutiner forbundet med stress

- Raske endringer i miljøforhold, som for eksempel temperatur, salinitet, trykk.
- Dårlig vannkvalitet.
- Sult.
- Begrensning av bevegelse (for lite plass).
- Sosialt stress (for mange individer på for liten plass eller feil strømforhold i karet).
- Naturlig atferd umulig (f.eks. stimfisk som holdes alene, gyteklare hunner som ikke kan/får gyte, visse bunnlevende fisker som ikke har tilgang på f.eks. sand å grave seg ned i).
- Fisken føler seg truet (ingen skjul, trangt, predator like ved, etc).
- Håndtering (inkl. bedøvelse) og annen menneskelig påvirkning.

5.3 Stress i eksperimentelle forsøk

Både i forsøk og i naturlige omgivelser er det ikke til å unngå at fisken utsettes for stress. Normalt betraktes stress som negativt i forsøkssammenheng, men stress er også en naturlig del av fiskens velvære, og et miljø uten noen form for stress kan også være uheldig i lengden. I en utfordrende situasjon i forsøket kan et kortvarig stress være mobiliserende og virke positivt på individets totale velferd. Et vanlig problem i forsøkssammenheng er imidlertid den begrensede mulighet til å flykte unna eller gjemme seg vekk, og det unaturlige miljøet som ikke har dannet grunnlag for den komplekse stressresponsen.

I fiskeforsøk kan stress overvåkes på gruppe og individnivå. Stress er en kompleks reaksjon, som kan være vanskelig å identifisere hos fisk. Biologiske faktorer som livsstadie, kjønn, alder, art og stamme og miljøfaktorer som årstid, vannkvalitet, temperatur, tetthet og kartype er alle med på å påvirke stressresponsen. Det er av betydning hvor store avvik det er mellom det eksperimentelle og naturlige miljøet til fisken. I tillegg kan fiskens genetiske bakgrunn spille en viktig rolle for hvordan den takler ulike former for stresseksposering.

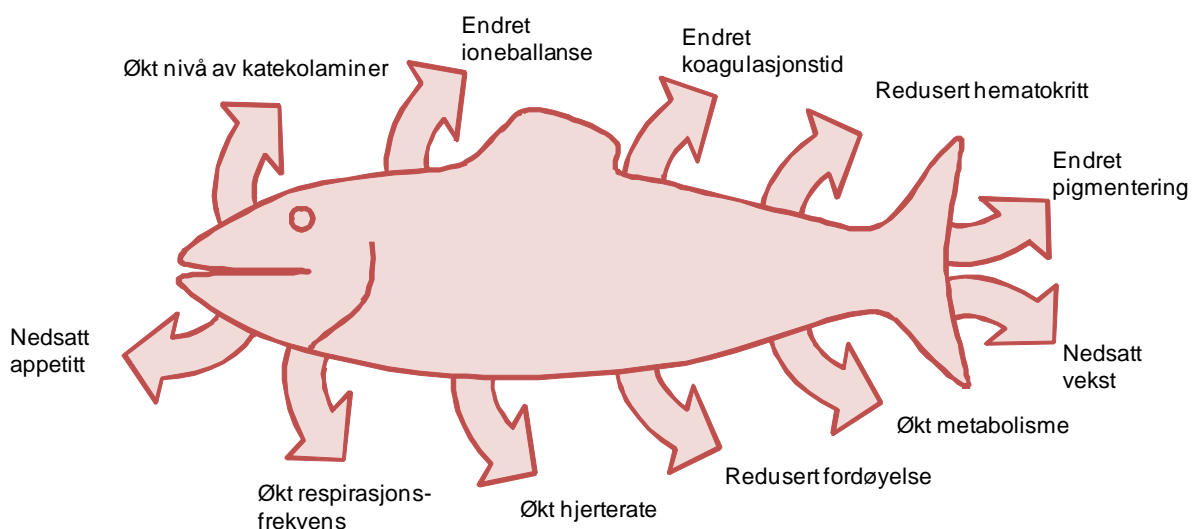
Normalt vil ikke den fysiologiske stressresponsen avvike mye mellom arter. Den største artsforskjellen på stressresponsen er å observere i atferd. En stimfisk vil naturlig nok kunne

reagere med en annen atferd enn en territorial fisk, men begge kan aktivere den samme biologiske stressresponsen i et forsøksoppsett hvor de eksponeres for samme stressor.

Forsøket er avhengig av karetts plassering. Kareffekt er et kjent fenomen i fiskeforsøk, hvor ulike forsøksgrupper responderer mer på ulik eksponering for stressorer enn selve forsøksbetingelsene. Avhengig av karplassering er det i vekstforsøk registrert stor vektforskjell mellom kar med kortest og lengst avstand til en mye brukt gangbro. Fisk som ofte forstyrres har et høyere fôrinntak, men en dårligere fôrutnyttelse, sammenlignet med fisk utsatt for få forstyrrelser. For å jevne ut kareffektene blir gruppene (fortrinnsvis flere paralleller) fordelt tilfeldig.

Hvorvidt optimale forsøksbetingelser kan beskrives som et miljø nærmest fritt for stressorer er tvilsomt. Et miljø nærmest "sterilt" for stresseksposering er i seg selv unaturlig og vil bety at det som i utgangspunktet er ubetydelige stressorer vil kunne ha et større bidrag på forsøket. Det er derfor en interessant problemstilling hvorvidt det er mulig å standardisere stresset med å eksponere karene for et gitt stressnivå. Blandede forsøksgrupper kan være en løsning for å normalisere stressresponsen, men fisk er en uhåndterlig dyregruppe for individuell behandling. I for eksempel ernæringsstudier vil fôring med ulike dietter i samme kar nærmest være en umulighet.

Fisk tilpasser seg vanligvis lett til normal røkting, som innebærer gjentatte og ofte tidsfikserte stimuli, som f.eks. fôring. I selve den eksperimentelle delen av forsøket kan fisken utsettes for stimuli eller behandling som medfører økt stress og smerte av kortere eller lengre varighet, som nevnt over. Hvorvidt en eksperimentell prosedyre medfører et akutt eller kronisk stress eller smerteopplevelse er av stor betydning for fiskens velvære og forsøkets vitenskaplige verdi. Generelt kan akutt stress tolereres, da det har en forbigående effekt, mens vedvarende kronisk stress vil kreve tiltak som fjerner eller letter belastningen fisken utsettes for. En generell oversikt over effekten av langvarig stresseksposering er gitt i Figur 7.2.



Figur 5.2. Stress i forsøk har stor effekt på fiskens fysiologi. Langvarig stresseksposering kan observeres som endringer i flere fysiologiske parametere.

5.3.1 Håndtering

Det er i dag godt etablerte metoder for håndtering av fisk på gruppe og individnivå. Hovedfokuset har imidlertid vært å unngå å utsette fisken for skader i slimlag, hud og gjeller. Fisken fanges vanligvis med hov, og i mindre forsøksgrupper tappes vannet ned og fisken "jaktet" med hoven. I forbindelse med håndtering løftes fisken ofte ut av vannet noe som også kan påvirke sirkulasjonssystemet. Dette kan være en situasjon med en betydelig, men tidsbegrenset stressrespons uten langvarig effekt på fisken. Fangning av fisken for håndtering over lengre tid vil kunne kreve bruk av anestesi når dette regnes som forsvarlig.

5.3.2 Merking

I forskning og forvaltning merkes fisk for å kunne gjenkjenne enten grupper av fisk eller individ. Stressbelastningen ved merking er i stor grad avhengig av merkemetode (inklusive trenet utførelse av prosedyren og korrekt valg og bruk av eventuelt bedøvelsesmiddel), art, livsstadium, fiskestørrelse vs. merkestørrelse, miljø, og ikke minst graden av håndtering og varighet av undersøkelsen. Det finnes mange forskjellige merkemetoder og de viktigste er: kjemisk merkning, genetisk merkning, merking med mekaniske merker og elektroniske merker. Ved genetisk og kjemisk merkning er det ingen eller ubetydelig ubehag, mens merking med mekaniske og elektroniske merker i de fleste tilfeller krever anestesi. Etter gjeldene etisk standard skal det søkes forsøksdyrutvalget når merkemetoden krever at man går gjennom huden på fisken. Effekten på fisken kan deles opp i korttids- og langtidseffekter. Korttidseffekter er effekter av stress knyttet til fangst, oppbevaring og merking. Det kan være atferdsmessige eller fysiologiske endringer. Langtidseffekter er endringer knyttet til den belastningen fisken påføres ved å bære selve merket. Det vil ofte være effekter knyttet til mekanisk slitasje og sår for eksterne merker og sårheling ved kirurgisk implantering. Det er risiko for at sårskader utvikler seg til større infeksjoner, og for at implantater aktiverer immunresponser og medfører inflammasjon. Det er observert at sendere kan innkapsles i bindevev.

Det er svært viktig at stressbelastningen ved fangst / innfangning og merking holdes så lav som mulig. Ved merking av villfisk kan dette gjøres ved å ha så kort tid fra fangst til utsetting som mulig. Videre er det viktig å ha gode rutiner tilpasset den arten det arbeides med. Langtidseffekter forventes å øke med størrelsen på selve merke og med hvilken merkemetode som benyttes. Det er derfor viktig at størrelsen og utformingen av merket tilpasses den arten og den merkemetode som velges. For å redusere stress og hindre smerte må det velges riktig bedøvelsesmiddel tilpasset den arten det arbeides med. Enkelte arter tåler ikke de bedøvelsesmidlene som er vanligst i bruk, sml. dyrevelferdsloven § 9 tredje ledd om nødvendig bedøvelse ved smertefulle inngrep. Det er viktig at konsentrasjonen justeres slik at fisken ikke får for lang tid i bedøvelsesbadet. Gode rutiner for bedøving av fisk gir redusert stress og kort tid før fisken gjenopptar tilnærmet normal atferd.

5.3.3 Ernæring

Fisken krever et fôr som er balansert ut i fra totalt energibehov som kan variere med livs stadium, årstid, temperatur og helsestatus. Fôret skal dekke energibehovet med utgangspunkt i en balansert sammensetning av fett, proteiner, essensielle aminosyrer, karbohydrater, vitaminer og mineraler. I forsøk benyttes i stor grad kommersielt fôr som er

tilpasset oppdrettsbetingelser hvor målet er en rask vekst. Hvorvidt dette fôret sikrer best mulig forsøksbetingelser avhenger mye av forøkets art. I for eksempel smitte og vaksineforsøk kan fôret representere en ekstra stressbelastning dersom sammensetningen gjør det tungt fordøyelig eller dårlig balansert.

Generelt representerer ikke fôret en betydelig kilde til stress i forsøk så lenge det dekker fiskens behov og er forenlig med en dynamisk vekst. Fiskens ernæring kan imidlertid representere en utfordring når det benyttes ikke-kommersielle arter med få eller ingen kartlagte ernæringsbehov. I flere tilfeller løses dette ved å "projisere" ernæringsbehov mellom slektsnære eller biotisk "samlokaliserte" arter.

Av hensyn til fiskeernæring, spesielt rettet mot akvakulturnæringen, utføres flere forsøk for kartlegging av fiskens ernæringsbehov. Manipulering med fiskens diett for bedre forståelse av ernæringsbehov kan forventes å være forbundet med mangelsykdommer. Det har lenge vært kjent at mangel på L-methionin fører til utviklingen av katerakt og nedsatt syn. Oppdrettsnæringen har siden den tid vært igjennom en rivende utvikling, mye grunnet et målrettet avlsarbeid. Dagens laks med et større vekstpotensial har nødvendigvis også et annet ernæringsbehov enn en sammenlignbar viltlevende stamme.

I den senere tid har begrensninger i tilgangen og økte kostnader på råvarer som for eksempel fiskeolje og fiskemel gjort at næringen ser seg om etter andre råvarekilder til fôrproduksjonen. Det er derfor i dag et betydelig fokus på bruk av vegetabiliske næringskilder til bruk i oppdrettssammenheng der fiskeoljer erstattes av planteoljer og fiskemel med vegetabiliske proteiner. Hvorvidt diettens bakgrunn vil påvirke fiskens velferd er fortsatt ukjent. Feilernæring i seg selv vill uansett være forbundet med stress og ubehag. Introduksjonen av vegetabiliske næringskilder introduserer nye utfordringer i form av plantevernrester som kan ha stor effekt på fisken.

5.3.4 Toksikologi

Fisken kan eksponeres for toksiske substanser enten gjennom mat eller i vannet med opptak hovedsakelig over tarm og gjeller, men også over hud. I forsøk kan det i spesielle tilfeller være aktuelt å injisere den toksiske substansen direkte i bukhulen eller blodet. Effekten på fisken er i stor grad avhengig av flere faktorer som annen stresseksposering, livsstadie, ernæringsstatus, temperatur, og miljø (herunder vannkvalitet), alle med stor betydning på hvordan fisken klarer å håndtere ulike toksikanter. Eksperimentelle toksikologistudier i fisk er enten av akutt eller kronisk karakter. For å forstå effekter av for eksempel akutte miljøutslipp eksponeres fisk for en enkelt høy-dose, mens det i kroniske forsøk benyttes subletale doser over lengre tid. Fisk vil kunne respondere ulikt på disse to eksponeringsstrategiene med svært forskjellige stressreaksjoner og andre belastninger.

Behovet for toksikologiske studier

- Bedre forståelse for biologisk og dyrevelferdsmessig effekt av eksponering.
- Støtte for myndighetene og forvaltningsorganenes risikovurdering.
- Kjemisk klassifisering.
- Regulatoriske behov på myndighetsnivå.
- Vann og kvalitetskriterier.

Vanligste fokus i forskning

- Karakteristikk av substansens giftighet for fisk.
- Effekt på fisk eksponert for lav subletal konsentrasjon i ulike livs stadier eller hele livet.
- Effekt av en enkelt gradvis eller akutt eksponering eller gjentatte eksponeringer.
- Artens sensitivitet.
- Hvordan påvirker miljøet den toksiske effekten.
- Er toksikologisk respons lik i laboratorium og i felt.
- Realistiske naturlige doser, og sikre konsentrasjoner.
- Sammensatt effekt av blandinger av ulike toksikanter.

Det må legges til grunn at akutte forsøk er forbundet med stress og påfører fisken en ubehagelig belastning både med hensyn til håndtering av substans og de toksiske effektene denne eksponeringen medfører. I noen forsøk kan den toksiske eksponeringen medføre fare for store og varige belastninger med ukjente effekter på fisken. Til illustrasjon vises til prinsippavgjørelse fra Forsøksdyrutvalget hvor det blant annet ble uttalt: "...fisketestene medfører at 50% av fiskene dør av akutt forgiftning...metoden innebærer alltid betydelige og ofte vedvarende lidelser for en andel av forsøksdyrene, og har derfor vært svært omstridt." Saken gjaldt giftighetstesting av kjemikalier til bruk i petroleumvirksomhet." (www.fdu.no).

Subletale doser gir ikke nødvendigvis noen umiddelbare observerbare tegn assosiert med stress, smerte eller ubehag. Til tross for normal atferd og fravær av klassisk stressrespons kan eksempelvis tarm eller gjeller påføres morfologiske endringer som kan være ubehaglige for fisken. De kjemiske substansene kan også påvirke spesifikke organ som øker belastningen over tid.

Flere toksikanter (f.eks. PCB-er) har hormonelle effekter av betydning for fiskens utvikling. Avhengig av metabolisme kan kronisk eksponering av morfisk med en lavdose toksisk substans medføre en akkumulering av substansen i gonadene med påfølgende høye doser i eggene. Med utgangspunkt i de befruktede eggene representerer dette da et høydoseforsøk med potensielt store effekter på fiskens utvikling i alle livsstadier. Dersom forsøket imidlertid avsluttes før metamorfose/ungelstadiet omfattes ikke forsøket av dyrevernlovgivningen eller de etiske retningslinjene for naturvitenskap og teknologi.

Generelt monitoreres toksikanter i et begrenset utvalg arter og resultater ekstrapoleres til andre arter i samme miljø. Ideelt bør det benyttes et større utvalg arter med ulike miljøpreferanser og atferdsstrategi. Dersom virkningsmekanismen til en toksikant er ukjent kan viktig fysiologisk informasjon overses. Samtidig forutsetter et større utvalg at man kjenner den aktuelle artens grunnleggende behov, både for å sikre forsvarlig velferd og unngå alvorlige feilkilder.

5.3.5 Implantater

Med bakgrunn i blant annet problematikker ved bruk av implantater for store rovdyr (inklusive belastning ved jaging, innfangning og immobilisering) har Forsøksdyrutvalget en prinsippavgjørelse som sier at det må foreligge tungtveiende grunner for bruk av

intraperitoneale radiosendere i dyr (www.fdu.no). Implantering av osmotiske pumper eller sendere i bukhalen vil i tillegg til belastning ved montering og eventuell inflammasjon også utgjøre en rigid struktur som ikke nødvendigvis vil følge fiskens bevegelser. Slike implantater kan derfor gjøre stor skade på organer og i bukvegg, og kan i ekstreme tilfeller gnage hull på bukveggen. Antenne til sender som henger ut fra bukhalen kan tære mot huden og forårsake sårskader og påfølgende infeksjoner. Det er derfor avgjørende at implantatet er utformet for å minimere slike mulige skader, og at kirurgisk prosedyre og festeteknikk verifiseres i studier på død eller bedøvet fisk og utføres av trent personell. I slike tilfeller kan bruk av implantater i liten grad påvirke fiskenes velferd, og kan da forsvares i forsøk der bruk av implantater ha høy relevans og nytteverdi. Bruken av implantater må også tilpasses blant annet art, individstørrelse og aktivitet.

5.3.6 Blodprøvetaking

Blodprøvetaking utgjør kanskje den mest anvendte metoden i fiskeforsøk. I flere typer forsøk analyseres en eller flere blodparametere. Blodprøvetaking er derfor en viktig metode, spesielt dersom samme fisk skal utsettes for gjentatte blodprøveuttak.

Størrelsen på fisken, behovet for blod til analyse og den videre bruken av fisken er avgjørende for hvilken metode som benyttes. Mengden blod som kan tappes fra en fisk uten større fysiologiske påkjenninger er bl.a. arts og temperaturavhengig. Med mindre forsøket tilsier noe annet, må individene være friske og robuste.

I dag er det hovedsakelig fire metoder som har fått størst anvendelse (alle under anestesi):

- Punktering av caudal vene.
- Kutting av hale (etter avlivning av f.eks. sebrafisk).
- Hjertepunktering (etter avlivning).
- Kanullering av dorsal aorta eller gjellebue.

Avhengig av utviklingsstadium, kan punktering av caudalvenen for tapping av blodprøve påføre fisken betydelige skader i ryggmargen som fører til deformiteter. Det er derfor ønskelig med bedre evaluering av metoder for blodprøvetaking, spesielt med hensyn til livsstadie.

5.3.7 Anestesi

For å begrense belastningene forsøksfisk utsettes for ved utstrakt håndtering, kirurgiske prosedyrer eller manipuleringer anesteseres fisken, jf. dyrevelferdsloven § 9 tredje ledd. Det er en forutsetning at belastningene ved anestesibehandlingen i seg selv ikke overstiger belastningene ved den eksperimentelle prosedyren. Generelt deles graden av anestesi inn i 5 nivå 0-4.

Det ideelle anestetikum for fisk kan defineres i følgende punkter:

- Gi tap av bevissthet og opphør av smertepersepsjon.
- Kort induksjonstid, helst mindre enn 3. min.
- Ikke påføre fisken vesentlig ubehag eller stress.
- Kort oppvåkning (recovery) etter bruk, 5. min eller mindre.
- Skal ikke være giftig for fisken, og ha en stor sikkerhetsfaktor.

- Kan håndteres uten problemer, og er skånsom mot mennesker.
- Skal ikke ha uønsket effekt på fiskens fysiologi eller atferd.
- Eksekteres og metaboliseres raskt. Bør ikke etterlate rester eller kreve karantene.
- Ingen problemer ved gjentatte behandlinger

Ved bruk av inhalasjonsanestesi er gjellene i nær tilknytning til sentralnervesystemet (CNS) hos fisk, hvilket gir en rask og effektiv anestesi i vann.

Ved injeksjonsanestesi er det viktig å ta høyde for at anestetika gitt intraperitonalt og venøst, kan få redusert effekt da vena cava passerer nyre/lever på veien til CNS.

Tabell 1. Stadier av anestesi hos fisk.

| Stadium | Plan | Beskrivelse | Atferd |
|---------|------|--------------------|---|
| 0 | | Normal | Aktive svømmebevegelser Normal reaksjon på eksterne stimuli Normal likevekt Normal muskeltonus |
| 1 | | Sedasjon | Reduserte svømmebevegelser Redusert reaksjon på visuelle og trykk stimuli |
| 2 | | Lett narkose | Delvis tap av likevekt Økt respirasjonsrate Spontane panikkbevegelser |
| 3 | 1 | Dyp narkose | Fullt tap av likevekt Nedsatt muskeltonus Reaksjon på kraftig trykk |
| | 2 | Kirurgisk anestesi | Ingen reaksjon på stimuli Ingen muskeltonus Langsom, dyp respirasjon Redusert hjerterate |
| 4 | | Medullær kollaps | Opphørt respirasjon Hjertestans Død |

Hvilken fiskeart man skal anestesere er av stor betydning siden ulike arter kan reagere forskjellig på anestesimidlene. Fisk med stor gjelleoverflate i forhold til total kroppsoverflate absorberer anestesien raskt og trenger en lavere dose anestesimiddel enn fisk med mindre gjelleoverflate. Innenfor en art vil også gjelleoverflaten i forhold til kroppsvekt avta eksponensielt, og opptaket og utskillelse av anestesimiddel avtar med økende kroppsvekt. Liten fisk vil derfor ha en kortere induksjons- og oppvåkningstid enn stor fisk av samme art.

Metabolismen kan variere med livsstadie, temperatur, sult/fôring/”absorptive state”, aktivitetsnivå, årstid og tid på døgnet, og nedbrytingen av anestesimiddel varierer med den metabolske aktiviteten. Følsomheten til anestesimiddel kan derfor deles opp i tre intervallstadier, larve - post larve, post larve - yngel og yngel - voksent individ.

I forsøk er det viktig å ta hensyn til effekten av anestesimiddel ved uttak av prøver og måling av fysiologiske parametere. I nevrofysiologiske studier foretrekkes bruken av muskel-

avslappende medikamenter fremfor anestesimiddel, dersom bivirkninger og rester i CNS er et relevant problem. Dette forutsetter imidlertid tillatelse fra Forsøksdyrutvalget, da slike prosedyrer ellers strider mot dyrevernlovgivningen.

Enkel anestesi har kun en midlertidig effekt på fiskens helse og velferd, men gjentatte behandlinger før fisken er restituerte kan resultere i dårlig velferd, herunder svekket helsestatus med påfølgende høy dødelighet.

5.3.8 Avliving

Avliving i seg selv skal ikke være forbundet med smerte, og håndtering i forkant skal være dyrevelferdsmessig forsvarlig og ikke stresse fisken unødig, jf. dyrevelferdsloven § 12. Valg av metoder for avliving av fisk er avhengige av antall fisk som skal avlives og formålet med / bruken av fisken etter avlivingen. Metoden som benyttes ved avliving skal være human, hvilket innebærer at fisken utsettes for et minimum av fysisk og mental belastning. Anatomi, fysiologi og atferd er viktige faktorer det må legges vekt på ved valg av metode for avliving av fisk.

Med utgangspunkt i dyrs velferd bør en akseptabel avlivingsmetode oppfylle følgende kriterier:

- Smertefri.
- Rask føre til tap av bevissthet og død.
- Krever liten grad av skade.
- Minimal aktivering av fisken.
- Tilpasset art, utviklingstrinn og størrelse.
- Tar hensyn til helsetilstand.
- Påfører fisken minimal frykt og stress.
- Sikker.
- Reproduserbar.
- Irreversibel.
- Enkel å bruke.
- Sikker for personale.
- Etisk akseptabel.

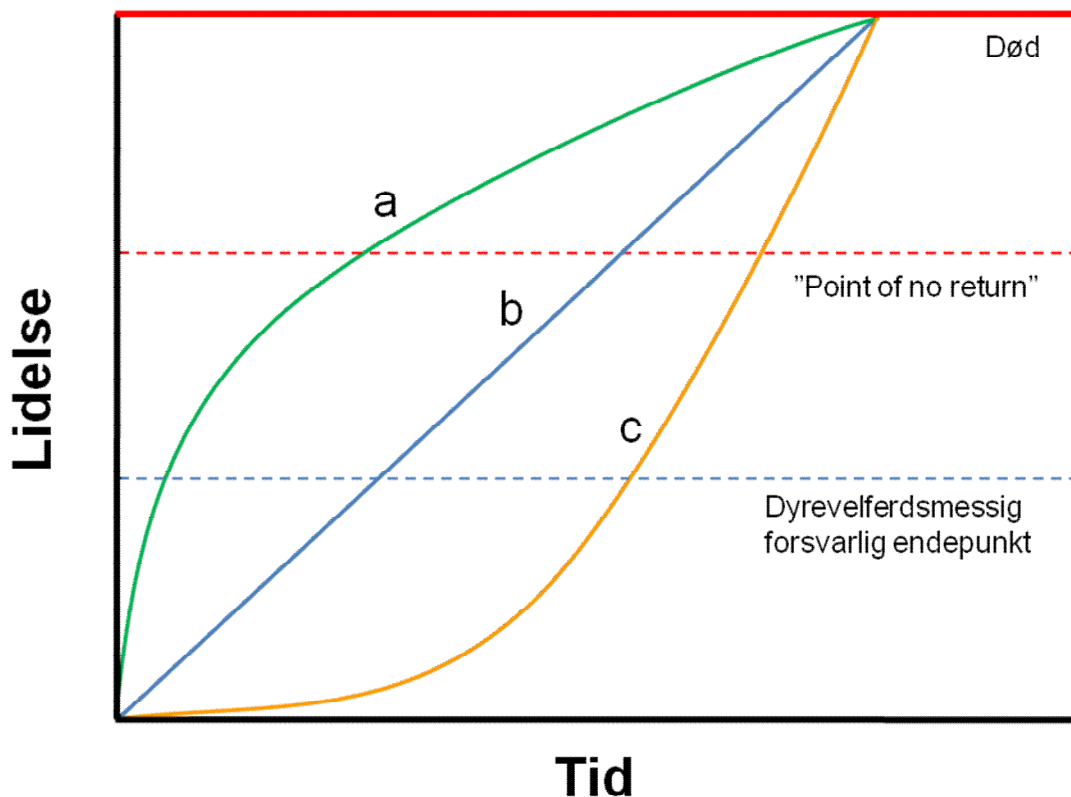
Slag med for eksempel en "priest/klubbe" mot fiskens hode eller dekapitering av anestesert fisk med kniv er tradisjonelle og effektive avlivingsmetoder av fisk. Avliving med hodeslag medfører betydelige blødninger og skader på hjernen og hodeknokler, mens dekapitering ikke gir mulighet for god blodprøvetaking. Størsteparten av stresseksposeringen i forbindelse med denne formen for avliving vil være selve innfangingen av fisken og håndteringen i forkant av avlivingen. Dersom forsøket skal analysere effekter i hjernevev eller hodeknokler blir fisken normalt avlivet med en kraftig anestesidose. Stressbelastningen her vil også omfatte innfangning, men eksponering for medikament vil kunne indusere stressresponser. Dersom hele forsøksgrupper skal avlives er det mulig å "anestere/roe" fisken ved å tilsette vannet medikament som reduserer (undertrykker) stressresponsen og opplevelsen.

I akvakulturnæringen er det et betydelig fokus på avlaving av fisk både i et etisk perspektiv, og av hensyn til produktkvalitet. Dette er grundig evaluert i rapporten Slaktesystemer for laksefisk i 2008 – fiskevelferd og kvalitet, Veterinærinstituttets rapportserie 01-2009.

5.4 Dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkt

Humane endepunkt er en oversettelse av engelsk "humane endpoint" benyttet i kliniske studier. Begrepet refererer her til hva som er en menneskelig / dyrevelferdsmessig forsvarlig måte å behandle dyr på, og sier noe om hvor lenge fisken kan utsettes for belastninger i forsøkssammenheng. Også når målene med forsøket er nådd, eller forsøket har "slått feil" vil man normalt måtte avslutte forsøket. I forsøksdyrsammenheng vil et på forhånd gitt endepunkt ofte være i betydning av at forsøkssituasjonen er forbundet med et uakseptabelt nivå av belastninger (Figur 5.1), men kan også bety at formålet med forsøket heller ikke rettfærdig- eller nødvendiggjør mindre alvorlige belastninger. Imidlertid kan også uforutsette belastninger tilsi at man definerer et tidligere endepunkt underveis i forsøket. Normalt vil det bli gjennomført flere analyser på levende eller mest sannsynlig avlivet fisk.

Humane/dyrevelferdsmessige forsvarlige endepunkt henviser til en tilstand hvor fisken ikke skal påføres ytterligere belastninger eller oppfyller et av de avsluttende målene definert i forsøket. En fisk som når et endepunkt ekskluderes fra forsøket.



Figur 5.1 Dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkt er viktige for å sikre god velferd i fiskeforsøk. Endepunktene må være objektive og enkle å måle med god margin i forhold til "point of no return". Eksempel på tre ulike forløp for måleparameter a, b og c er skissert.

I motsetning til forsøk på eksempelvis pattedyr med god oppfølging av enkeltindivider vil endepunkt i fiskeforskning kunne ha en videre betydning. Avsluttende endepunkt kan gjelde enkeltindivid i en gruppe, hele gruppen eller forsøket i sin helhet. Det er derimot ingen klare retningslinjer for hvor stor andel av en forsøksgruppe som må være positive på et eller flere endepunkt, for at gruppen eller hele forsøket avsluttes. Definisjon av et avsluttende endepunkt vil i stor grad være avhengig av type forsøk, parametere som måles og kunnskap om hvordan de eksperimentelle betingelsene påvirker fisken. Hvorvidt et avsluttende endepunkt kan brukes på enkeltindivid, gruppe, forsøksoppsettet eller en sammensetning av disse beror i stor grad på mulighet for observasjoner og analysemetoder.

Det vil også være en stor grad av overlapp mellom avsluttende endepunkt og velferdsindikatorer, da endring i et endepunkt ofte vil være basert på en eller flere velferdsindikatorer. Et forsøk med pattedyr skal ha definerte og tydelige endepunkt, men i forsøk med fisk blir ofte endepunktene generelle. Det er derfor behov for med presise endepunkt representative for forsøket og de parametrene som analyseres. Når et endepunkt først observeres kan fisken ha vært utsatt for ubehag og misstrivsel over lengre tid. I toksikologiske forsøk hvor fisk eksponeres for miljøgifter gjennom fôret kan det ta relativt lang tid før det observeres endringer i fiskens stressrespons, mens det på et tidligere tidspunkt kan observeres endringer i organer.

Det er derfor viktig å etablere gode overvåkingsrutiner med endepunkt som har mulighet til å fange opp effekter av forsøksbetingelsene på fisken på et tidligst mulig tidspunkt.

5.4.1 Forsøksoppsettet – indikative endepunkt

Parametere i selve forsøksoppsettet kan være gode indikatorer for nærmere undersøkelser om forsøket har nådd et avsluttende endepunkt.

| Lokalitetsnivå | |
|-----------------------|--|
| Oksygenforbruk | Et lavt oksygeninnhold i utløpsvann markerer et høyt oksygenforbruk ofte forbundet med stress. |
| Ammoniakk | Utskillelse av ammoniakk kan være tegn på økt metabolisme, og settes i sammenheng med økt stressbelastning. |
| Katekolaminer | Nivå av katekolaminer i avløpsvann gir en indikasjon på stressnivået til fisken utsettes for på lokaliteten. |

Gruppenivå – dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt På gruppenivå måles en effekt på hele eller et representativt utvalg av gruppen. Det er mere generelle parametere.

| Gruppenivå | |
|--------------------|--|
| Atferd | Hvordan fisken responderer på røkter eller andre "kjente" stressorer som et lite dunk i tanken kan være den beste stresstesten. Posisjonering i karet og utnyttelse av vannsøylen er også god stressindikator. |
| Respirasjon | Frekvensen og styrken på gjellelokksbevegelsen kan være en god indikator på oksygenbehovet som vanligvis øker ved stresseksposering. |
| Appetitt | Misstrivsel kan hos fisk observeres med nedsatt appetitt. |
| Vekst | Hvorvidt gruppens biomasse ikke følger en naturlig vekstkurve basert på de forsøksbetingelsene fisken eksponeres for kan skyldes stress i forsøksoppsettet. |
| Kondisjon | I relasjon til livsstadium kan forholdet mellom vekt og lengde være et mål på velferd (stress) . |
| Homogenitet | Er det stor spredning i gruppens fordeling på en eller flere parametere kan det gi en indikasjon på stress og ubehag. |
| Helsestatus | Stresset fisk vil ha et svekket immunforsvar, og utbrudd av "påførte" og latente infeksjoner kan være en indikasjon på stresseksposering. |
| Dødelighet | Hvorvidt det er et naturlig frafall av individ eller om det oppstår en akutt dødelighet som følge av eksperimentell eksponering er en viktig indikator på forholdene i forsøksgruppen. Det samme gjelder forhøyet dødelighet over tid. |

Individnivå – dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt

På individnivå observeres fisk som skiller seg ut fra resten av forsøksgruppen eller et representativt utvalg av forsøksgruppen.

| Individnivå | |
|-----------------------------|---|
| Atferd | Posisjonering og avvikende atferd i forhold til resten av forsøksgruppen kan være et signal på individuelt forringet velferd. |
| Respirasjonsfrekvens | Enkeltindivid som skiller seg ut fra resten av forsøksgruppen med betydelig annerledes respirasjonsfrekvens og / eller styrke kan være klare tegn på velferdsproblem. |
| Pigmentering | Endring i fiskens pigmentering kan i stor grad settes i sammenheng med stresseksponering og redusert velferd. |
| Vekst | Redusert vekst kan indikere redusert appetitt eller økt metabolisme som respons på kronisk stress og redusert velferd. |
| | Flere fysiologiske parametere gir informasjon om fisken sin stresstilstand. |
| | <i>Hematokritt</i> <i>Gir et mål på forholdet mellom plasma og blodceller</i> |
| | <i>lonebalanse</i> <i>lonesammensetning i blodserum eller -plasma.</i> |
| Fysiologi | <i>Blodceller</i> Celletelling og identifisering av cellyper kan gi en god beskrivelse av fisken helsetilstand. I tillegg kan måling av stressproteiner frisatt til blodet være en god indikator på stressnivået fisken utsettes for. |
| | <i>Blodgasser og pH</i> Reduserte nivåer av O ₂ , og pH, økte nivåer av CO ₂ eller andre metabolitter. |
| | <i>Stressindikatorer</i> Høye nivåer av stresshormoner (katekolaminer og kortikosteroider) er en direkte indikator på økt stress. Økte (evt. redusert for glukose) nivåer av de sekundære stressparametrene glukose og laktat. |
| Patologi | Tegn på misdannelser, organskader og infeksjoner er et tegn på ubehag. |

5.5 Forskningsbehov

5.5.1 Smertereaksjon hos fisk

- Grunnleggende og spesifikk kunnskap om hvor og hvordan potensielt smertefulle stimuli registreres og prosesseres i fiskens hjerne (f.eks. hjerneanatomi, neuronale mekanismer, hjernefunksjon).
- Grunnleggende fysiologisk og atferdsmessig kunnskap om kognisjon, bevissthet og smerte og frykt hos fisk.
- Økt kunnskap om endogene opioider og effekten av ulike smertestillende midler på det perifere og sentrale nervesystem.
- Gode bedøvingsmedikamenter som gir smertefrihet (analgesi) og tap av bevissthet og, som ikke utsetter fisken for vesentlige belastninger.
- Hvordan målbare indikatorer (f.eks. fysiologiske responser, atferd) relateres til opplevelsen av potensielt smertefulle stimuli hos fisk.
- Evaluere graden av smerte forbundet med ulike metoder for blodprøvetaking og avliving.

5.5.2 Generell stressrespons

- Hvordan forebygge stressorer i miljøet.
- Kartlegge ulike arters habituering til nye eksperimentelle betingelser.
- Grunnleggende kunnskap for identifisering og kvantifisering av kronisk stress.
- Påvise årsaker og konsekvenser av forskjeller i sensitivitet til stress mellom individer, arter og livsstadier.
- Grunnleggende kunnskap / karakterisering av forsøksfiskens akutte stressrespons.
- Variasjoner i akutt stressrespons (fysiologi og atferd) ut fra art og livsstadie.
- Variasjon mellom arter og livsstadier. Kan variasjoner knyttes til forskjeller i fiskenes biologi (økologi, fysiologi, atferd) eller systematiske plassering?
- Positivt vs negativt stress.
- Hvordan varierer responsene avhengig av stressortype, grad og varighet.

5.5.3 Eksperimentelt stress

- Etablering av harmoniserte dietter basert på ernæringsbehov tilpasset art og utviklingsstadium.
- Håndtering uten anestesi for ulike arter (angi tidsintervall mht livsstadie og temperatur).
- Evaluere ulike metoder for blodprøvetaking med fokus på dyrevelferd, aktivering av stressresponser og langtidseffekter.
- Effekt av gjentatte blodprøveuttak med samme prosedyre. Dette gjelder spesielt ved punktering av kaudalvene og evt. påfølgende inflammasjoner og arrdannelse.
- Avlivingsmetoder som ikke utsetter fisken for vesentlige belastninger.
- Hvilke anestesimidler fungerer best på de ulike artene og utviklingsstadie.
- Interaksjon mellom anestesi og ulike forsøksbetingelser.

- Kort og langvarig effekt av anestesi.
- Stress og smerte knyttet til merking, merkemetoder og merkeeffekter på kort og lang sikt.
- Identifisere generelle og artspesifikke parametere for evaluering av velferd og subletale doser av toksiske substanser.
- Etablere et referanseoppsett for toksikologisk evaluering på representative fiskearter i norske farvann.

5.5.4 Dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt

- Identifisere parametere i vannet som kan brukes som endepunkt.
- Identifisere stressproteiner i blodet.
- Definerte endepunkter for ulike arter.
- Definerte endepunkter for ulike typer forsøk.
- Grenseverdier for ulike endepunkt.
- Krav til pilotstudier for definering av avsluttende endepunkt.
- Forholdet mellom negative velferdsindikatorer og endepunkt.
- Hvor omfattende er begrepet dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt (individ/gruppe).

5.6 Referanser

Endpoints setting, monitoring and humane termination for experiments using fish, Standard Operating Procedure, University of Victoria, Animal Care Unit.

<http://www.research.uvic.ca/ethics/SOPs/Aquatics/SOP%20Endpoints%20setting%20fish%20Dec%2013%202007.pdf>

Guidelines - Human Experimental Endpoints versjon 2.0, Office of animal care and institutional Biosafety

<http://tiger.uic.edu/depts/ovcr/research/protocolreview/acc/policies/0324.pdf>

Guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research teaching and testing. Canadian Council on Animal Care.

http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/APOPEN.pdf

The biology of animal stress – Basic principles and implications for animal welfare Moberg GP og Mench J A

Ashley P.J., Sneddon L.U., McCrohan C.R. (2007). Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Research* 29 1166, 47-54.

Bateson P. (1991) Assessment of pain in animals. *Animal Behaviour* 42, 827-839.

Braithwaite V.A., Boulcott P. (2007). Pain perception, aversion and fear in fish. *Diseases of aquatic organisms* 75, 131-138.

Dunlop R, Laming P. (2005). Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Pain*. 6, 561-568.

Beulig A., Fowler J. (2008). Fish on Prozac: effect of serotonin reuptake inhibitors on cognition in goldfish. *Behavioural Neuroscience* 122, 426-432.

Portavella M., Torres B., Salas C. (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of Neuroscience* 24, 2335-42.

Rodríguez F., Durán E., Gómez A., Ocaña F.M., Alvarez E., Jiménez-Moya F., Broglio C., Salas C. (2005). Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Research Bulletin* 66, 365-370.

Sneddon L.U. (2004). Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Review* 46, 123-130.

Sneddon L.U., Braithwaite .V.A., Gentle M.J. (2003) Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society London B* 270, 1115-21.

6 Smertelindring av fisk

Trond Brattelid og Elisabet Forsgren

I dyreforsøk (inkludert forsøk på fisk) forbundet med smerte skal smertelindring (analgesi) benyttes for å begrense belastningene dyret utsettes for. Anestesi har også smertelindrende effekt, men begrepet omfatter også dyp søvn med tap av bevisste sanseinntrykk. Analgesi virker smertelindrende ved å blokkere reseptorer i nervesystemet forbundet med nocisepsjon og tolkning av nociseptoriske signaler. Behovet for smertelindring i fiskeforsøk er ukjent, og det skyldes i all hovedsak begrenset kunnskap innen tolkning av smerte hos fisk (se kapitel 5). Imidlertid skal føre var prinsippet brukes, slik at fisken gis adekvat smertelindring når det er fare for at prosedyren kan være forbundet med smerte.

I smertebehandling av pattedyr benyttes medikamenter som interfererer enten med nocisepsjonen eller tolkningen av nocisepsjonen. De vanligste medikamentene er ikke-opoide analgetika, opoide analgetika og lokalanestetika. Behandlingsregime er avhengig av årsak og varighet av smerten.

Det er klart at fisk oppfyller flere av de kriteriene som settes til å registrere smertefulle stimuli. Videre er det påvist reseptorer og neurotransmittorer som er antatt å være involvert i tolkningen av smerteopplevelsen i hjernen. På atferdsresponsen til fisk er det også observert nedsatt respons på potensielt smertefulle stimuli etter administrasjon med tradisjonelle smertestillende medikamenter. Dette er indikatorer gode nok til å anta at fisk utsatt for det som forventes og defineres som smertefulle stimuli i forsøk må og kan behandles. Hva som er smertefullt for fisken tolkes, i praksis, i stor grad ut på atferdsresponsen. Tolkningen av hvorvidt behandlingen gjelder akutt eller kronisk smerte vil i all hovedsak støtte seg på vurderinger i lys av eksperimentelle metoder og atferd til fisken som benyttes i forsøket.

6.1 Smertebehandling på individ eller gruppenivå

Fisk kan smertebehandles med flere ulike metoder. Det er imidlertid avhengig av om det er snakk om et enkeltindivid eller en hel gruppe. Et ufravikelig krav må være at smertelindringen i seg selv ikke øker belastningen for fisken.

I grupper kan smertelindrende medikamenter tilsettes enten i vannet og tas opp hovedsakelig over gjellene (ferskvannsfisk) eller i mage-tarmsystemet (saltvannsfisk). En annen mulighet er å administrere et smertelindrende medikament i fôret for opptak i mage-tarmsystemet. Dette er enkle metoder som lett lar seg gjennomføre, men kan være vanskelige å dosere. Fisk som er utsatt for smerte kan ha nedsatt appetitt og derfor være vanskelig å behandle gjennom fôret. Behandling i vann gir god kontroll med konsentrasjonen, men dosen hver fisk eksponeres for vil kunne avhenge av respirasjonsfrekvens og respirasjonsstyrke, samt permeabilitet til gjellene.

På individnivå er det mulig å gi fisken injeksjoner eller dyppe den i bad med smertestillende medikament. Dette er metoder som er forventet å være forbundet med betydelig stress og derfor lite egnet til smertebehandling av fisk. I forsøk med kirurgiske inngrep som er forventet å være forbundet med smerte kan det legges inn depot eller osmotisk pumpe med smertestillende medikament som lekker ut over tid. Osmotiske pumper, mye brukt på tradisjonelle forsøksdyr, finnes i ulike størrelser, men bruken vil begrense seg til fisk over en gitt størrelse. Disse pumpene baserer seg på at et hulrom i kapselen fylles med medikament i flytende form. Hulrommet er begrenset av en impermeabel membran som er omgitt av en hyperosmotisk gel som vil tiltrekke seg kroppsvæske og derigjennom komprimere hulrommet slik at medikamentet pumpes ut av kapselen over en gitt tid (se for eksempel: <http://www.alzet.com/>). Hastigheten på disse pumpene er temperaturavhengige, og forsøk med store temperatursvingninger kan gjøre doseberegninger vanskelig. Hvorvidt fiskens smerteopplevelse er temperaturavhengig er usikkert. Redusert metabolisme og aktivitet som følge av redusert temperatur er ikke en indikator på nedsatt smerteopplevelse.

Effekten av depoter vil være tidsbegrenset, og bruken vil avgrense seg til akutt smertelindring etter for eksempel et operativt inngrep eller forventet smertefull prosedyre som kun krever kortvarig behandling.

Smertebehandling av fisk må være av en karakter som ikke påfører fisken større ubehag. Det å fjerne en eventuell smerteopplevelse kan føre til at fisken ikke evner å unngå skadelige situasjoner og ender opp med en situasjon som kan karakteriseres som selvskading. Likeledes kan smertebehandling på "frisk" fisk også resultere i endringer i atferd som må overvåkes som en viktig velferdsindikator.

6.2 Forskningsbehov

- Karakterisere hva som er, og hva som ikke er, smertefullt for ulike fiskearter.
- Metoder for skånsom og effektiv smertelindring.
- Effekt av smertelindring.
- Doseringer for ulike fiskearter-/individer.
- Grunnleggende kunnskap om hvor og hvordan de mest aktuelle smertelindrende midlene virker (mekanismer er bl.a. viktig for valg av rett middel for gitt forsøksdesign)
- Effekt av akutt smertebehandling.
- Effekt av kronisk smertebehandling.
- Er smerteopplevelsen påvirket av temperatur/miljø.
- Effekt av smertelindring på velferdsindikatorer.

7 Vaksineutvikling og fiskevelferd

Tom Hansen

Den voldsomme veksten i norsk og internasjonal havbruksnæring hadde ikke vært mulig uten vaksinasjon. Oppdrettsnæringen hadde svært alvorlige sykdomsproblemer i perioden fra midten av åttitallet fram til 1992. I hovedsak skyldes dette epidemier av de to bakterielle infeksjonssykdommene kaldtvannsvibriose (også kalt "Hitrasylke") og furunkulose. De økonomiske konsekvensene var store, forekomsten av sykdom og sykelighet gav uakseptabel dyrevelferd og behandling med antibiotika gav uakseptable miljøvirkninger. Før effektive vaksiner ble tilgjengelige var terapeutisk behandling med antibiotika eneste mulighet til bekjempelse.

Vaksiner mot bakterielle patogener er med visse unntak svært effektive i dag. 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.

Vaksinasjon er i dag en forutsetning for en sykdomsforebyggelse som kan gi akseptabel grad av dyrevelferd. Men forbruket av forsøksdyr i forbindelse med utviklingen av vaksinene utgjør mesteparten av de nesten 3.4 millioner fisk som ble registrert som forsøksdyr i 2007. Samtidig er vaksinasjon beheftet med bivirkninger som i seg selv kan gi velferdsmessige problemer. Disse bivirkningene er i hovedsak lokale immunreaksjoner/betennelser, sammenvoksninger, melanindeponering og effekter på vekst og skjelettdeformasjoner. Sammenvoksninger og skjelettdeformasjoner er antakelig de bivirkningene som generelt er av størst etisk og velferdsmessig betydning.

7.1 Vaksiner og vaksinasjonsmetoder

Den aller 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, som stresser fisken mest og som har de mest åpenbare bivirkningene. Flerkomponentvaksinene som brukes mot furunkulose, vibriose, kaldtvannsvibriose, vintersår og IPN er et eksempel på slike vaksiner. Andre vaksineringsmetoder er *bad/dypp* som blant annet brukes mot vibriose på marin yngel og orale vaksiner som gis gjennom fôret. *Orale* vaksiner ville sannsynligvis være den mest skånsomme vaksineringsmetoden, men denne metoden har til nå dessverre vist seg å være lite effektiv. Det finnes imidlertid en IPN vaksine for oral administrasjon som virker.

I sin enkleste form er vaksiner basert på drepte eller svekkede mikroorganismer. Vaksinene 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 effekten av vaksinen. 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.

Nye vaksinekonsepter som rekombinante vaksiner basert på genomikk/proteomikk kan gi bedre beskyttelse og vesentlig lavere bivirkninger hvis de tas i bruk i fremtiden. Det samme gjelder såkalt DNA-vaksinering, 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, men det er viktig å merke at slike vaksiner har gitt lovende resultater mot alvorlige virussykdommer. Eventuelle livssynsmessige, etiske eller politiske føringer mot bruk av slik teknologi bør vektas mot dyrevelferdsmessige, miljømessige og økonomiske hensyn.

7.2 Myndighetskrav ved utvikling av en vaksine

Statens Legemiddelverk setter minimumskrav rundt godkjenningen av vaksiner også til fisk. Den kliniske utprøvingen i forbindelse disse godkjenningrutinene utgjør mesteparten av forsøksdyrene som brukes i Norge.

For sykdommene vibriose, furunkulose og kaldtvannsvibriose finnes det farmakopea monografier som beskriver disse minimumskravene. Gjeldende furunkulose monografi er vist i Figur 7.1.

For en vaksine skal det etter dette regelverket dokumenteres sikkerhet, effekt, "onset" (hvor tidlig effekten av vaksinen setter inn) og varighet av effekt.

Før vaksinen settes til klinisk utprøving gjennomføres det en test på sikkerhet og effekt. Dette er tester som i Norge typisk gjennomføres på Vikan eller ILAB. Testen skal gjennomføres på minst tre "batcher" av vaksinen og på alle arter som vaksinen er laget for. Testen skal gjennomføres med dobbel dose vaksine og en observasjonstid på 21 dager. Testen på effekt skal gjennomføres på minst 100 fisk som skal holdes i kar sammen med like mange kontrollfisk og testen skal gå til mer enn 60% av kontrollfiskene er døde. Testen er ugyldig hvis dødeligheten i kontrollgruppen er lavere enn 60% 21 dager etter at den første fisken døde. Det bør undersøkes hvor mange fisk som påføres lidelse som en direkte konsekvens av reglene fra legemiddelregelverket, og om endepunktet skulle vært satt tidligere ut fra målet med forsøket, eller ut fra behovet for å avslutte lidelsene.

Hvis vaksinen består kravene til denne innledende labtesten kan vaksinen settes ut i klinisk utprøving. Testen skal gjennomføres på minst to anlegg og Statens legemiddelverk vil normalt innvilge at utprøving av en vaksine omfatter inntil 10 lokaliteter (matfiskanlegg) og inntil 1 million doser av testvaksinen. Dette kan imidlertid fravikes dersom særlige grunner tilsier det (<http://www.legemiddelverket.no>). Produsenten bør argumentere for valg av lokaliteter, og det er en forutsetning at lokalitetene har en historisk bakgrunn med forekomst av en eller flere av de(n) aktuell(e) sykdom(mer) som vaksinen skal beskytte mot. Tre ganger i løpet av produksjonssyklus skal det tas ut fisk for evaluering av lokale reaksjoner (etter vaksinerings, midt i tilvekstperioden og ved slakting). Moderate lokale reaksjoner aksepteres, men vaksinen godkjennes ikke hvis mer enn 10% av fisken får alvorlige bivirkninger.

Når vaksinen blir satt i produksjon skal hver vaksinebatch testes for effekt og sikkerhet. Effekt testes slik som beskrevet over for labforsøk på sikkerhet og effekt, men med minst 30 fisk. Alternativt kan testen baseres på målinger av spesifikke antistoffer mot patogenet. Da skal det målte antistoffnivået ikke være signifikant lavere enn i en gruppe hvor det er vist tilfredsstillende beskyttelse. Sikkerheten testes ved at minst 10 individer vaksineres med dobbel dose ved minst 10°C i henhold til anbefalt protokoll for vaksinen. Fisken skal observeres i 21 dager og ingen unormale lokale eller systemiske reaksjoner aksepteres. Testen er ugyldig hvis mer enn 10% av fisken dør av årsaker som ikke kan tilskrives vaksinen.

| | |
|---|--|
| <p style="text-align: right;">01/2005:1521</p> <p style="text-align: center;">FURUNCULOSIS VACCINE (INACTIVATED, OIL-ADJUVANTED, INJECTABLE) FOR SALMONIDS</p> <p style="text-align: center;">Vaccinum furunculosis ad salmonidas inactivatum cum adjuvazione oleosa ad iniectionem</p> <p>DEFINITION Furunculosis vaccine (inactivated, oil-adjuvanted, injectable) for salmonids is prepared from cultures of one or more suitable strains of <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>.</p> <p>PRODUCTION The strains of <i>A. salmonicida</i> are cultured and harvested separately. The harvests are inactivated by a suitable method. They may be purified and concentrated. Whole or disrupted cells may be used and the vaccine may contain extracellular products of the bacterium released into the growth medium. The vaccine contains an oily adjuvant.</p> <p>CHOICE OF VACCINE COMPOSITION The strains included in the vaccine are shown to be suitable with respect to production of antigens of assumed immunological importance. The vaccine is shown to be</p> | <p>satisfactory with respect to safety (5.2.6) and efficacy (5.2.7) in the species of fish for which it is intended. The following tests may be used during demonstration of safety and immunogenicity.</p> <p>Safety</p> <p>A. During development of the vaccine, safety is tested on 3 different batches. A test is carried out in each species of fish for which the vaccine is intended. The fish used are from a population that does not have specific antibodies against <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> and has not been vaccinated against or exposed to furunculosis. The test is carried out in the conditions recommended for the use of the vaccine with a water temperature not less than 10 °C. An amount of vaccine corresponding to twice the recommended dose per mass unit is administered intraperitoneally into each of not fewer than 50 fish of the minimum body mass recommended for vaccination. The fish are observed for 21 days. No abnormal local or systemic reaction occurs. The test is invalid if more than 6 per cent of the fish die from causes not attributable to the vaccine.</p> <p>B. Safety is also demonstrated in field trials by administering the intended dose to a sufficient number of fish in not fewer than 2 sets of premises. Samples of 30 fish are taken on 3 occasions (after vaccination, at the middle of the rearing period and at slaughter) and examined for local reactions in the body cavity. Moderate lesions involving localised adhesions between viscera or between viscera and the abdominal wall and slight opaqueness and/or sparse pigmentation of the peritoneum are acceptable. Extensive lesions including adhesions between greater parts of the abdominal organs, massive pigmentation and/or obvious thickening and opaqueness of greater areas of the peritoneum are unacceptable if they occur in more than 10 per cent of the fish in any sample. Such lesions include adhesions that give the viscera a "one-unit" appearance and/or lead to manifest laceration of the peritoneum following evisceration.</p> <p>Immunogenicity. The test described under Potency is suitable to demonstrate the immunogenicity of the vaccine.</p> <p>BATCH TESTING</p> <p>Batch potency test. For routine testing of batches of vaccine, the test described under Potency may be carried out using not fewer than 30 fish per group; alternatively, a suitable validated test based on antibody response may be carried out, the criteria being set with reference to a batch of vaccine that has given satisfactory results in the test described under Potency. The following test may be used after a satisfactory correlation with the test described under Potency has been established.</p> <p>Use fish from a population that does not have specific antibodies against <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> and that are within defined limits for body mass. Carry out the test at a defined temperature. Inject intraperitoneally into each of not fewer than 25 fish one dose of vaccine, according to the instructions for use. Perform mock vaccination on a control group of not fewer than 10 fish. Collect blood samples at a defined time after vaccination. Determine for each sample the level of specific antibodies against <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> by a suitable immunochemical method (2.7.1). The vaccine complies with the test if the mean level of antibodies is not significantly lower than that found for a batch that gave satisfactory results in the test described under Potency. The test is not valid if the control group shows antibodies against <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>.</p> |
| | <p>IDENTIFICATION</p> <p>When injected into fish that do not have specific antibodies against <i>A. salmonicida</i>, the vaccine stimulates the production of such antibodies.</p> <p>TESTS</p> <p>Safety. Use not fewer than 10 fish of one of the species for which the vaccine is intended, having, where possible, the minimum body mass recommended for vaccination; if fish of the minimum body mass are not available, use fish not greater than twice this mass. Use fish from a population that preferably does not have specific antibodies against <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> or, where justified, use fish from a population with a low level of such antibodies as long as they have not been vaccinated against or exposed to furunculosis and administration of the vaccine does not cause an anamnestic response. Carry out the test in the conditions recommended for use of the vaccine with a water temperature not less than 10 °C. Administer intraperitoneally to each fish an amount of vaccine corresponding to twice the recommended dose per mass unit. Observe the animals for 21 days. No abnormal local or systemic reaction attributable to the vaccine occurs. The test is invalid if more than 10 per cent of the fish die from causes not attributable to the vaccine.</p> <p>Sterility. The vaccine complies with the test for sterility prescribed in the monograph on <i>Vaccines for veterinary use (0062)</i>.</p> <p>POTENCY</p> <p>Carry out the test according to a protocol defining limits of body mass for the fish, water source, water flow and temperature limits, and preparation of a standardised challenge. Vaccinate not fewer than 100 fish by a recommended route, according to the instructions for use. Perform mock vaccination on a control group of not fewer than 100 fish; mark vaccinated and control fish for identification. Keep all the fish in the same tank or mix equal numbers of controls and vaccinates in each tank if more than one tank is used. Carry out challenge by injection at a fixed time interval after vaccination, defined according to the statement regarding development of immunity. Use for challenge a culture of <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> whose virulence has been verified. Observe the fish daily until at least 60 per cent specific mortality is reached in the control group. Plot for both vaccinates and controls a curve of specific mortality against time from challenge and determine by interpolation the time corresponding to 60 per cent specific mortality in controls. The test is invalid if the specific mortality is less than 60 per cent in the control group 21 days after the first death in the fish. Read from the curve for vaccinates the mortality (<i>M</i>) at the time corresponding to 60 per cent mortality in controls. Calculate the relative percentage survival (RPS) from the expression:</p> $\left(1 - \frac{M}{60}\right) \times 100$ <p>The vaccine complies with the test if the RPS is not less than 80 per cent.</p> <p>LABELLING</p> <p>The label states information on the time needed for development of immunity after vaccination under the range of conditions corresponding to the recommended use.</p> |

Figur 7.1. Europeisk pharmacopoeia for oljevaksine mot furunkulose for laksefisk.

7.3 Velferdsmessige aspekter knyttet til vaksinerings og vaksineutvikling

Årlig vaksineres om lag 270 mill laks og ørret. Hoveddelen blir stikkvaksinert i buken med oljebaserte vaksiner. Det brukes både manuell vaksineringsmaskiner. Kvaliteten på arbeidet under selve vaksineringsmaskiner. Kvaliteten på arbeidet under selve vaksineringsmaskiner kan ha mye å si for resultatet både med hensyn til beskyttelse og bivirkninger. Eksempelvis er stikkpunkt, nål, kalibrering av utstyr, sortering, hygiene, bedøvelse og sulting osv viktig for å unngå feilstikk eller manglende vaksineringsmaskiner. Feilstikk i filet eller inn i organ/blindsekker, dårlig hygiene, opprispet sårkant osv kan være med å øke grad av bivirkninger.

Det er skrevet omfattende veiledninger for vaksineringsmaskiner, vaksinasjonskontroll og oppfølging. 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.

De store velferdsmessige konsekvensene ligger mest sannsynlig i bivirkningene som følger med den intraperitoneale vaksineringsmaskiner. I dette ligger også et stort dilemma i det faktum at det i dag er en meget god sammenheng mellom beskyttelse og bivirkninger. Med dagens vaksineteknologi må en derfor veie disse mot hverandre og en god vaksine vil derfor gi god beskyttelse med en "akseptabel" grad av bivirkninger Figur 7.2.



Figur 7.2 De velferdsmessige konsekvensene av vaksineringsmaskiner av fisk kan beskrives som en ballansegang mellom sykdomsbeskyttelse og bivirkninger.

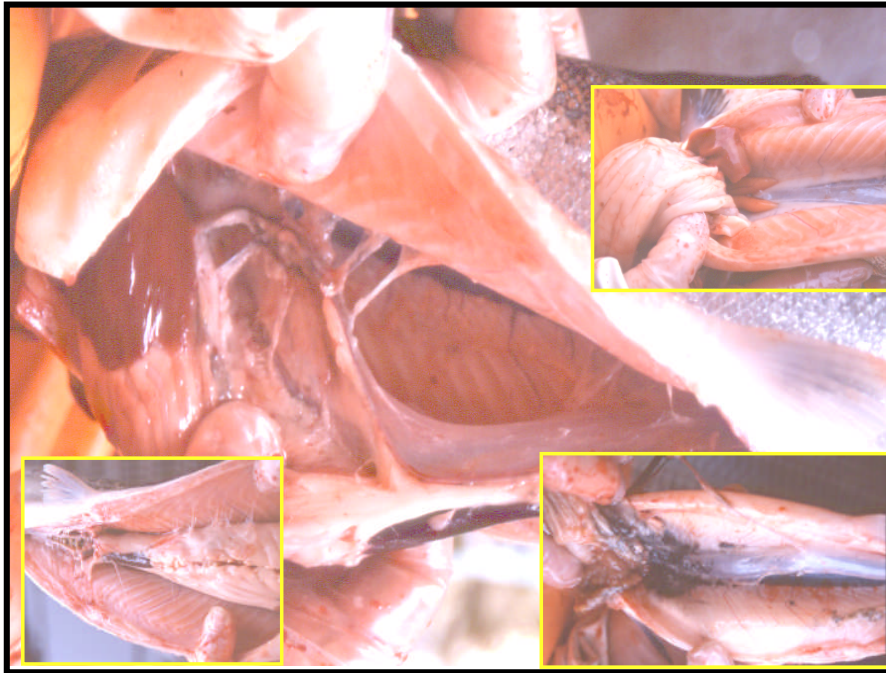
7.4 Bivirkninger av vaksinasjon

7.4.1 Vaksinasjon, immunreaksjoner og sammenvoksninger i bukhulen

Med introduksjon av oljebaserte vaksiner i lakseoppdrett fikk man også bivirkninger. All vaksinert fisk fikk inflammasjoner ved injeksjonsstedet, og de fleste fikk sammenvoksninger mellom organer, og mellom organer og bukvegg (Figur 7.3).

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, 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, og er en viktig årsak til problemene med sammenvoksninger med oljebasert vaksine som inkluderer furunkulose.



Figur 7.3. Sammenvoksninger og melandindeponering i bukhulen etter vaksinasjon av laks.

Utfordringen er derfor å lage en vaksine som gir tilstrekkelig beskyttelse mot de 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, og ligge innenfor det som er dyrevelferdsmessig forsvarlig.

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. Erfaringsmessig har det også vist seg at det er større problem med sammenvoksninger i produksjon av høstsmolt enn i vårsmolt. 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 etisk, velferdsmessig og økonomisk 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. Ved bruk av oljebasert vaksine ser man tendenser til samme problem som hos laks mht sammenvoksninger.

7.4.2 Melanindeponering

Melanin i bukhulen

En normal immunreaksjon etter vaksinerings vil også innebære tilstrømming av bl.a. melano-makrofager 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.

Skult melanin i filet

I oppdrettsnæringen er svart pigmentering i fileten på slaktet fisk et av de problemene som nå har størst fokus. 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.

Årsaken til disse flekkene er uklar, men en undersøkelse av melaninflekker på slaktelinje fant muskelnedbryting med nekrotisk vev, typisk inflammatorisk vev med granulom inneholdende melano-makrofager, samt vakuoler med lipider. Melaniserte områder i laksefilet er dannet av en inflammatorisk reaksjon, trolig induert av vaksinasjon. I dette studiet var det imidlertid ikke inkludert en uvaksinert kontroll. I studier med vaksinert og uvaksinert fisk på Havforskningsinstituttet er det funnet like mye skult melanin på uvaksinert fisk som i vaksinert fisk. I vaksinert fisk var det heller ingen sammenheng mellom vaksinetypen, eller grad av sammenvoksninger i bukhulen som følge av ulike injeksjonsdoser.

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.

7.4.3 Påvirkning av vekst

Korttidseffekt

Laks har redusert appetitt en kort periode etter vaksinerings, men korttidseffekten på vekst kan ha flere årsaker som stress, smerte, at energien brukes til immunreaksjon istedenfor vekst osv. Laks injisert med saltvann fikk ikke vekstreduksjon, og fisk som bare ble bedøvd og håndtert fikk ikke redusert appetitt. Dette tyder på at det er reaksjonen på vaksinen som skaper redusert appetitt, og ikke håndtering, bedøvelse, vaksinasjonssticket, eller injeksjonen i bukhulen i seg selv. Reaksjonen kommer like etter vaksinerings og sammenvoksninger er ennå ikke etablert. Perioden med redusert vekst er vanligvis 2-6 uker. I noen tilfeller viser vaksinert fisk kompensasjonsvekst og er like stor som uvaksinert fisk ved

sjøvannsutsett. Korttidseffekt på vekst av vaksinasjon er også funnet på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), røye (*Salvelinus alpinus*), sik (*Coregonus lavaretus* L.), og flekksteinbit (*Anarhichas minor* L.) og kveite (*Hippoglossus hippoglossus*). Hos torsk (*Gadus morhua* L.) er det ikke rapportert tilsvarende vekstreduksjon.

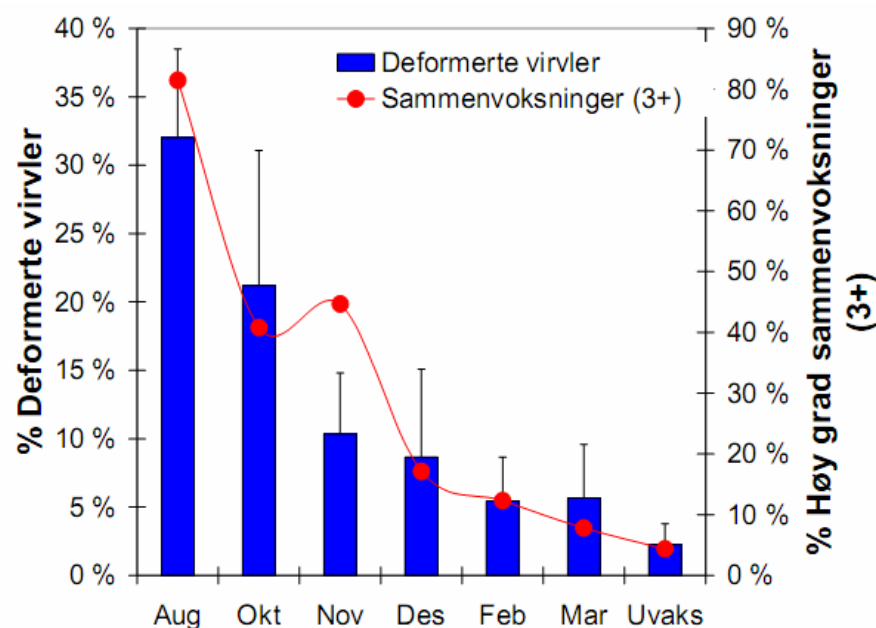
Langtidseffekt

I flere forsøk er det funnet at vaksinert laks vokser dårligere enn uvaksinert laks i sjøvann. I tillegg har både vaksinetype og vaksinasjonstidspunkt vist langtids effekter på vekst. Det er imidlertid også mange eksempler på at det ikke er forskjell i vekst mellom vaksinert og uvaksinert fisk. Det er også funnet 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.

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. I tillegg kan immunreaksjoner, helingsprosesser, ubehag e.l. endre metabolismen og allokering av tilgjengelig energi, eller dette kan gi endret atferd eller appetitt med redusert fôropptak.

7.5 Vaksinasjon og virveldeformasjoner

I flere forsøk ved Havforskningsinstituttet er det funnet sammenheng mellom vaksinasjon og virveldeformasjoner (Figur 7.4). I andre forsøk er det funnet at vaksinasjon har påvirket skjelettvekst, virvelmorfologi, mineralisering og/eller virvlenes fysiske egenskaper uten at dette har gitt seg utslag i deformasjoner. I ytterligere andre forsøk er det ikke funnet sammenheng mellom vaksinasjon og deformasjoner.



Figur 7.4. Effekt av vaksinasjonstidspunkt på ettårssmolt 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 lengre i markedet. Fra Berg m.fl. (2006).

En felles faktor for alle forsøkene på Havforskningsinstituttet, hvor det er blitt observert en betydelig andel deformert fisk, er at også den uvaksinerte fisken har hatt deformasjoner. Vaksine/vaksinasjon har i disse studiene kunnet forklare mellom 50 og 90 % av deformasjonene. Viktige risikofaktorer for nedklassing av laks på slaktelinje er vaksinetype og vaksinasjonstidspunkt, smolttype (0+, 1+) og lokalitet. Vaksinasjon forklarer 50 % av variasjonen i deformasjoner. Den høye forklaringsgraden kan forklares med at det i næringen ikke finnes uvaksinert fisk som kan brukes som kontroll.

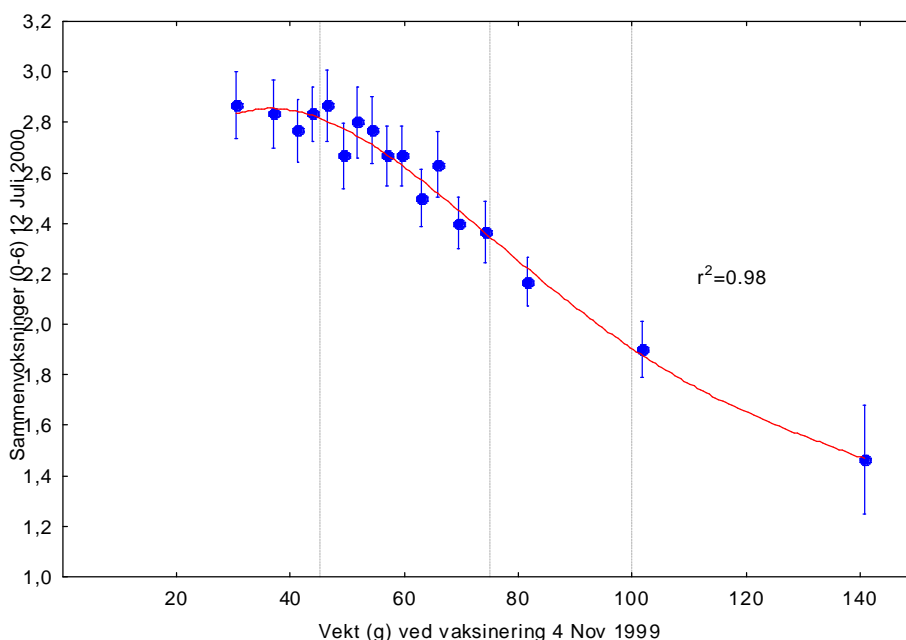
7.6 Faktorer som kan påvirke utvikling av bivirkninger

7.6.1 Temperatur

Temperatur ved vaksinerings og i første periode etter vaksinerings er kanskje den viktigste faktoren for utvikling av sammenvoksninger. Antistoffresponser og beskyttelse blir påvirket tilsvarende. En lignende dynamikk er også observert gjennom livssyklus hvor en finner en nedgang i sammenvoksninger gjennom vinteren og en økning om sommeren. Dette viser at så lenge det er et vaksinedepot er det en dynamisk balanse mellom utvikling og heling av sammenvoksninger.

7.6.2 Fiskestørrelse

Det er en klar sammenheng mellom fiskestørrelse ved vaksinerings og utviklingen av sammenvoksninger i bukhulen (Figur 7.5). Denne effekten finner en både ved høye og lave temperaturer.



Figur 7.5. Effekt av fiskestørrelse ved vaksinerings av laks på utvikling av sammenvoksninger. I forsøket ble det brukt individmerket 1+ smolt, vaksinert på høsten. Sammenvoksninger ble vurdert nesten 2 år senere. Vaksinen brukt i forsøket er ikke i bruk i dag, slik at nivået er høyere enn dagens vaksiner normalt gir (Fra Berg m.fl. 2007).

7.6.3 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. Det vil være særlig interessant å finne ut om i hvilken grad positive miljøforhold og god velferd generelt, kan forebygge bivirkninger.

7.6.4 Viktige momenter for å øke velferden i vaksineforsøk

1. I vaksinestudier bør en unngå å vaksinere ved høye temperaturer hvis dette ikke er en spesifikk del av studiet.
2. I vaksinestudier bør en unngå å vaksinere (injeksjonsvaksiner) liten fisk hvis dette ikke er en spesifikk del av studiet.
3. Vaksinestudier bør ikke gjøres på grupper av fisk som har høy risiko for å utvikle andre belastninger (eksempelvis skjelettdeformasjoner) hvis ikke dette er en spesifikk del av studiet.

7.7 Konklusjon

Vaksinering i oppdrett er i dag nødvendig for å unngå sykdom og dødelighet. Fravær av vaksinasjon ville raskt ført til sykdomsproblemer med uakseptable konsekvenser for dyrevelferd og miljø. Samtidig er omfanget av bivirkninger et alvorlig dyrevelferdsmessig problem, og i denne sammenheng er det sentralt at fisken ofte kan leve lenge, gjerne frem til slaktetidspunkt, med kroniske belastninger.

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 vektes 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. Bivirkninger av vaksiner er likevel et betydelig velferdsproblem, og det er nødvendig å utvikle bedre vaksiner. Det er 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.

7.8 Forskningsbehov

- I fisk er individvariasjonen og miljøvariasjonen stor. For mus finnes en "Specific Pathogen Free" (SPF) mus som gjør at antallet dyr i forsøk kan reduseres betydelig. Det bør kunne utvikles spesielle forsøksdyrlinjer for laks (f.eks klonete, innavla eller SPF linjer) som kunne vært brukt innledningsvis i vaksinstudiene. Disse kunne gi mer spesifikke svar og redusere behovet for forsøksdyr i feltstudiene.
- De europeiske pharmacopoeia monografene må videreutvikles/forbedres med tanke på å redusere antallet forsøksdyr. Eksempelvis så er det allment kjent at effekttesten som er beskrevet i furunkulose monografen ikke gir tilfredstillende svar. Den gjennomføres allikevel fordi den er et myndighetskrav, men gjøres i tillegg til andre tester.
- Utvikling av nye vaksinekonsepter med minimale bivirkninger.

7.9 Referanser

Anonym (2003) "Best practise manual" for stikkvaksinering av laksefisk. Forte brukerstøtte, ScanVacc-Novartis. 26s.

Berg, A., Fjellidal, PG., Harboe, T. og Meeren, Tvd., (2003) Skjelettdeformasjoner - Havforskningsinstituttets arbeid med å kartlegge årsaksforhold og løsninger. HavforskningsTema 3-2003

Berg, A., Rødseth, OM., Hansen, T. 2007. Fish size at vaccination influence the development of side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 265: 9–15

Berg, A., Rødseth OM., Tangerås, A., Hansen, T. 2006. Time of vaccination influences development of adherences, growth and spinal deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dis. Aquat Org. 69: 239-248.

Colquhoun DJ, Skjerve E, Poppe TT (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. J Fish Dis 21:355-364

Fjellidal PG & Grotmol (2005) Virveldeformasjoner hos Atlanterhavs laks Havforskningstema 5-2005

Gudding, Roar. 2000. Immunoproylakse i veterinærmedisinen. Scandinavian Veterinary Press, Oslo. 325pp

Hansen, E-K (2001) Effekt av temperatur på vaksinebivirkninger hos laks (*Salmo salar* L.). Hovedfagsoppgave, Universitetet i Bergen

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

Ingilæ M, Arnesen JA, Lund V, Eggset G (2000) Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 183:31-44

Kolleståg, A (2005) Vaksinerer av laks – hva er riktig stikkpunkt. Intervet agenda, 2: juni.

Koppang EO, Haugarvoll E, Hordvik I, Aune L & Poppe TT (2005) Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.) white muscle. J Fish Disease 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
- Larssen RB & Djupvik HO (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. p10-11, 36
- Lillehaug A, Lunestad BT, 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. *Dis Aquat Org* 53:115-125
- Lower, N., Moore, A. (2003). Exposure to insecticides inhibits embryo development and emergence in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 431-432.
- Lund RA, Midtlyng PJ, Hansen LP (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
- Midtlyng PJ (1996) A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol* 6:553-565
- Midtlyng PJ, Reitan LJ, Lillehaug A, Ramstad A (1996a) Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish Shellfish Immunol* 6:599-613
- Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996b) Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol* 6:335-350
- Midtlyng PJ (1998) Evaluation of furunculosis vaccines in Atlantic salmon. Experimental and field studies for assessment of protection and side-effects. *Dr. Scient.- avhandling*, Norges veterinærhøgskole, Oslo
- 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
- Mikkelsen H, Schøder MB, 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 Shellfish Immunol* 16: 633-644
- Mutoloki S, Brudesth B, Reite OB, Evensen Ø (2006) The contribution of *Aeromonas salmonicida* extracellular products to the induction of inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with oil-based vaccines. *Fish Shellfish Immunol* 20:1-11
- Nygård S (2005) Evaluering av noen vaksineringsmaskiner. Intervet agenda, 2: mai
- 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* accepted.
- Poppe TT, Breck O (1997) Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Dis Aquat Org* 29:219-226.
- Pylkkö P, Lyytikäinen T, Ritola O, Pelkonen S (2000) Vaccination influences growth of Arctic charr. *Dis Aquat Org* 43:77-80

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, 88s

Sommerset I., Krossøy, B., Biering, E., og Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines* 4(1), 89-101.

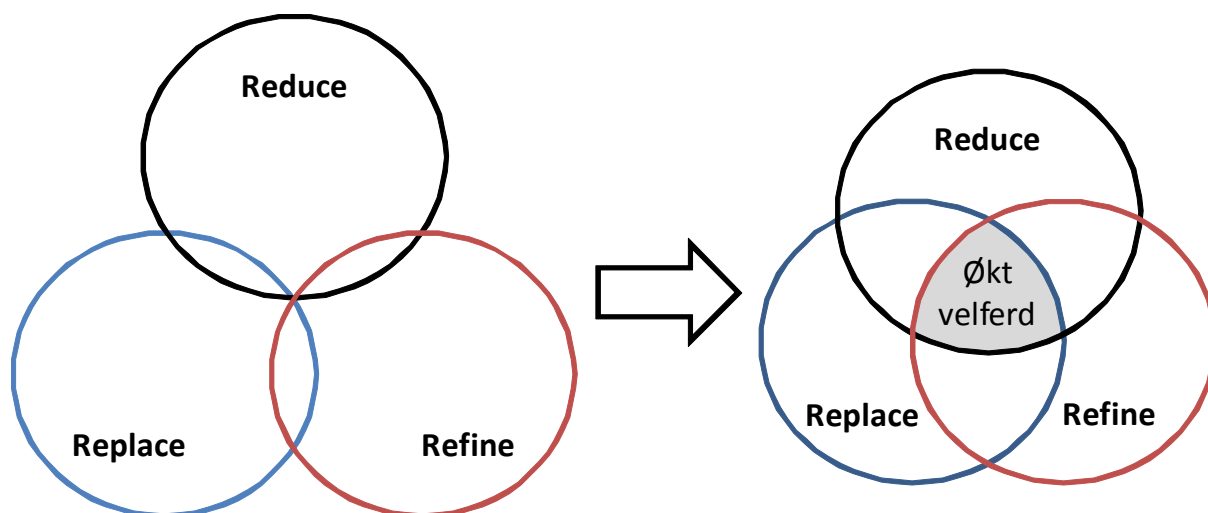
Sørum U, og Damsgård, B (2004) Effects of anaesthetization and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 232:333-341

Vågsholm I, Djupvik HO (1999) Risk factors for abdominal adhesions in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 22:53-58

8 Implementering av de 3 R-ene i forskning på fisk

Trond Brattelid og Bente Ruyter

Det brukes mye resurser på fisk i forskning i dag, ikke bare i Norge. Internasjonalt øker bruken av fisk som forsøksdyr, først og fremst som følge av den betydelige utviklingen i akvakulturnæringen og lovpålagte miljøtoksikologiske undersøkelser og overvåking. I tillegg utføres det en god del basalbiologisk og biomedisinsk forskning med bruk av rene modellfisk som sebrafisk. Denne utviklingen bør stimulere til økt fokus på bruken av fisk som forsøksdyr og sikre innarbeiding av de 3 R-ene ved bruk av fisk i forskning. Implementering av de 3 R-ene i alle faser av et dyreforsøk øker som oftest kvaliteten på forskningen ved at de eksperimentelle miljøforhold er optimalisert og harmonisert, og stress og smerteeksponering er minimalisert. Samlet bidrar de 3 R-ene til bedre og mer pålitelige resultater.



Figur 8.1 De 3 R-ene bidrar hver for seg til henholdsvis å redusere, erstatte og raffinere fiskeforsøk. Ved aktivt å bidra til å styrke bruken av de 3 R-ene i alle forsøkets faser er det mulig å oppnå bedre og mer pålitelige resultater med bruk av mindre antall fisk, og med mindre belastninger for fisken som brukes og med mindre belastninger for fisken som brukes..

All forskning på dyr må rette seg etter dyrevernsloven (dyrevelferdsloven) og forskrift om forsøk med dyr” og ikke minst ”Forskningsetiske retningslinjer for naturvitenskap og teknologi” utarbeidet av ”Den nasjonale forskningsetiske komité for naturvitenskap og teknologi” (www.etikkom.no). Disse lovtekstene stiller brukere av dyr i forskning strafferettslig ansvarlig for behandling og hold av dyrene. Det forutsettes også at det tas hensyn til de 3 R-ene både i planlegging og gjennomføring av forskningen. Implementering av de 3 R-ene krever imidlertid god kunnskap om hvordan de ulike forsøksmodellene påvirker fisken i forsøk, med hensyn til stress, ubehag og smerte, hvor spesifikke og sensitive de biologiske endepunktene er og hvordan alternativer til fisk kan benyttes for å undersøke de samme biologiske funksjonene/parameterene.

Lover og regler alene vil ikke nødvendigvis være de sterkeste drivkreftene for bedre implementering av de 3 R-ene i fiskeforskning. Forsøksdyruttanning spesielt tilrettelagt for ansvarshavende, forskere og teknikere/ingeniører som jobber med fisk i forskning vil være

helt avgjørende dersom de 3 R-ene skal få et økt fokus i forskning på fisk. Det finnes i dag ikke noe kvalitetssikret kursmaterieell i forsøksdyrlære for fiskeforskere. Etablering av et nasjonalt standardisert kursmateriale med jevnlig oppdateringer vil være helt avgjørende for den fremtidige implementeringen av de 3 R-ene i forskning på fisk.

De 3 R-ene: - prinsipper for bruk av forsøksdyr

Reduce - redusere: oppnå sammenlignbare resultater med færre dyr eller mere informasjon med samme antall dyr.

Replace - erstatte: unngå bruk av dyr eller erstatte dyr som omfattes av dyrevernloven (dyrevelferdsloven, ikraft 1.01.2010) når dyreforsøk ikke er til å unngå.

Refine - raffinere: Unngå eller begrense smerte og belastning og fremme dyrevelferd til forsøksdyr.

Forsøksdyr representerer en forenkling av en kompleks og sammensatt virkelighet. Det er først når observasjonene i forsøk samsvarer med naturen at resultatene fremstår som troverdige og bidrar til en kvalitativ vitenskapelig forståelse. Kilden til troverdige resultater fra forskning på fisk ligger derfor først og fremst i velanalyserte og godt vitenskapelig fundamenterte problemstillinger med et forsøksoppsett som tar hensyn til fiskens naturlige biologi og velvære. Disse forholdene alene, alle forenlig med god forskning, vil være sterkt drivende for å fremme de 3R-ene - "Reduce, Replace og Refine".

8.1 "Reduction" av fisk i forsøk

Erstatning av fisk i forskning kan gjennomføres ved å benytte livsstadier eller arter som ikke berøres av lovverket eller modellfisk med mulighet for stor grad av harmonisering av miljøbetingelser. I den senere tid har det vært et økende fokus på bruk av cellekulturer som erstatning for fisk i forskning. Dette kan være aktuelt spesielt mhp mekanistiske problemstillinger men samtidig vil det være et spørsmål om overføringsverdien av slike forsøk til organismenivå. De tiltak som iverksettes for å redusere antall fisk som benyttes i forskning må tuftes på et grunnlag som ikke går ut over kvaliteten på forskningen.

Størstedelen av forsøksfisk benyttes i dag innen utvikling av akvakulturnæringen med både offentlige og kommersielle aktører. Det betyr at det kan være flere forsøk med nærmest identiske problemstillinger som gjennomføres nesten samtidig. En landsdekkende database i regi av Forsøksdyrutvalget med oversikt over gjennomførte, pågående og planlagte forsøk kunne bidra til å begrense bruken av antall fisk eller bedre definerte problemstillinger for å unngå unødvendige parallellforsøk. Det er imidlertid viktig å ta hensyn til kommersielle (men også i stadig større grad offentlige) aktører med ønske om å beskytte sine forretningsinteresser i utvikling av f.eks. nye patenter.

Ikke alle forsøk som gjennomføres på fisk blir publisert. Det kan skyldes flere grunner som for eksempel at forsøket er del av en kommersiell utprøving eller problemer med forsøksoppsett. Dette representerer et unikt datamateriale flere burde ha kjennskap til. Innføring av et pålegg om offentliggjøring av alle forsøk i en sentral database etter en gitt tid etter at et forsøk er avsluttet kan bidra til å redusere stor grad av overlappende forsøk.

Samtidig vil en slik ordning bidra til å kvalitetssikre de forsøk som gjennomføres og å stimulere til publisering av flere forsøk.

For å skaffe seg relevante og karakteristiske resultater må det stilles krav til fiskens miljø og velvære. Dårlige og unøyaktige resultater fører bare til forvirring og underbygger prosessen for tolkning og forståelse av fiskeforsøkets problemstilling. For bedre tolkning av resultater basert på fiskeforsøk bør derfor rapporter og publikasjoner suppleres med en detaljert miljø- og helse-beskrivelse. Igjen er det mulig å stille krav gjennom Forsøksdyrutvalget om at et minimum av informasjon som beskriver miljøforhold og helsetilstand skal være tilgjengelig etter at et forsøk er avsluttet/publisert. Disse opplysningene bør være offentlig tilgjengelig og knyttes opp til en database administrert av Forsøksdyrutvalget. Miljøforhold under eggstadiet før klekking kan føre til f.eks. misdannelser som ikke skyldes eksponering for miljøgift eller førsammensetning.

Nye problemstillinger og dyrevelferdsmessige endepunkt vanskeliggjør beregningen av antall fisk som trengs for å gjennomføre et forsøk. I slike tilfeller bør det være et krav at det utføres et pilotforsøk for å kartlegge hvordan fisken responderer på miljø og hvor sensitive og spesifikke endepunktet/endepunktene er. Et større krav til gjennomføring av pilotforsøk kan gjøre arbeidet med et forsøk mer tidkrevende, da spesielt sesongvariasjoner kan ha en viss betydning for hvordan fisken responderer på forsøksbetingelsene.

I tillegg til laboratorium og storskala forskning utøves det også feltforsøk hvor fisk fanges, merkes og slippes fri for å overvåke for eksempel gjenfangst eller vandring av et gitt fiskeslag. Det bør vurderes i hvilken grad store feltbaserte aktiviteter som involverer store mengder forsøksdyr (f.eks innen fangstrelaterte studier) kan gjennomføres i modellskala i et forsøksanlegg. I denne typen studier er det imidlertid viktig at forsøket også har relevans slik at ikke modellforsøket kommer i tillegg til den feltbaserte aktiviteten.

Beregning av forsøksgruppens størrelse representerer en betydelig utfordring og er blant annet bestemt av kunnskap om fiskens miljøkrav, arts- og familieforskjeller, individuelle variasjoner i atferd og fysiologi innen arten/familien, sesong- og døgnvariasjoner, og ikke minst kunnskap om fiskenes miljøkrav. For alle disse parametrene må man i tillegg ta hensyn til variasjoner knyttet til forsøksfiskenes utvikling og livsstadie, inklusive eksempelvis kjønnsmodning og for laks smoltifisering.

Hvordan man beregner størrelse på en forsøksgruppe, antall replikaer og hvor mange individ som representerer et målepunkt i en enkelt forsøksgruppe har vært diskutert over lengre tid uten at det er kommet til noen klar enighet. Etablering av matematiske modeller som tar hensyn til flere av disse parametrene og søker å gi et bedre estimat på antall fisk nødvendig for å besvare en eller flere gitte problemstillinger vil være av stor betydning for å tilpasse og å begrense bruken av fisk i forskning.

8.2 "Replacement" av fisk i forsøk

Erstatning av fisk i forskning kan gjennomføres ved å benytte livsstadier eller arter som ikke berøres av lovverket eller modellfisk med mulighet for stor grad av standardisering av miljøbetingelser. I tillegg vil erstatning av forsøksfisk med alternativer eller bedre modeller

bidra til reduksjon i bruk av dyr i forskning. I den senere tid har det også vært et økende fokus på bruk av cellekulturer som erstatning for fisk i forskning. Det vil alltid være et spørsmål om overføringsverdien av slike forsøk. Ønsket om å redusere antall forsøksdyr ved å bruke f.eks. andre livsstadier som ikke omfattes av lovverket og cellekulturer må være basert på etablerte metoder som gir biologisk overførbare resultater.

Sebrafisk er i en særstilling da det er en ren modellfisk med flere genmodifiserte linjer og benyttes derfor i stadig større grad i biomedisinsk forskning. I forskningsmiljøer som tradisjonelt bruker pattedyr i sin forskning kan deres bidrag til "replacement", det å benytte modellfisk som sebrafisk, være en faktor som vil være med på å drive opp antall fisk i forskning. Bruken av fisk i forskning må derfor også sees i en større sammenheng med hvilke arter forsøksdyr som benyttes i forskning.

8.2.1 Cellekultur

Økt bruk av celler i kultur er et nyttig forskningsverktøy som kan redusere den utstrakte bruken av levende fisk i forsøk. Resultater fra celleforsøk kan danne grunnlag for mer eksakte hypoteser for nødvendige dyreforsøk, og dermed unngå unødvendige forsøk. Dette har i de senere årene ført til at man i forskningsmiljøer satser sterkt på å erstatte noen av dyreforsøkene med cellekulturstudier.

For at celler i kultur skal kunne erstatte levende fisk i forsøk, bør de ideelt sett ha opprettholdt tilsvarende funksjoner som cellene i kroppen. De såkalte primærcellene er i denne sammenheng meget egnet, da de er isolert fra levende vev og organer og har opprettholdt det meste av cellens normale funksjoner. Etablerte cellelinjer (ofte kreftceller) er også et nyttig forskningsverktøy, men her må man være oppmerksom på at cellene kan ha endret en del funksjoner sammenlignet med celler fra levende dyr. Fordelen med cellelinjer er derimot at de ofte finnes kommersielt tilgjengelig, og ikke behøver å isoleres fra levende dyr.

De siste årene har forskerne lyktes i å dyrke primære celletyper isolert fra mange av fiskens ulike vev, som celler fra lever, tarm, immunceller (makrofager, hvite blodceller), fettceller, muskelceller, nerveceller m.fl.

Celler i kultur er spesielt egnet til å studere grunnleggende funksjoner som ofte er vanskelig/og eller også smertefulle å studere i levende dyr. Celler er videre et meget godt egnet modellsystem til å teste ut effekten av ulike næringsstoffer, legemidler og smittestoffer i første fase før uttesting på levende dyr. Testsubstansen tilsettes cellenes dyrkningsmedium for å studere om middelet har den ønskede effekt på cellene. Viser det seg ikke å ha noen positiv effekt, eller være potensielt giftig for organismen, så kan man unngå å teste dette ut på levende fisk. Dersom testmiddelet derimot viser seg å ha en gunstig effekt på cellene kan man gå videre, og teste dette ut på forsøksdyr. Forut for forsøk på levende fisk kan man også gjennomføre dose-respons studier med celler i kultur for å få indikasjoner om hvilke nivåer levende fisk kan tåle. Man kan ikke helt unngå forsøk med levende dyr i siste fase, da man fortsatt er ute av stand til å simulere samtlige prosesser i kroppen. Celleforsøk er allikevel generelt meget godt egnet til å ekskludere testsubstanser uegnet for videre testing på levende dyr (f.eks. stoffer med toksiske effekter). I stedet for å

teste en mengde forskjellige stoffer på levende dyr, kan man ideelt sett eliminere et stort antall av dem i de første innledende celleforsøkene.

Det er ubestridt at celler som modellsystem kan redusere antall dyreforsøk, og det bør derfor satses på videreutvikling av disse systemene. Tilgangen på denne metodologien vil ha stor økonomisk, etisk og miljømessig nytteverdi.

8.3 "Refinement" av fisk i forsøk

"Refinement" bidrar til økt dyrevelferd og vitenskapelig kvalitet i dyreforsøk og derigjennom også til reduksjon i antall dyr brukt i forskning. Et ufravikelig krav ved bruk av forsøksdyr er å unngå eller i det minste å begrense bruken av prosedyrer forbundet med smerte og belastning. Begrepet "Refinement" begrenser seg ikke bare til å redusere negative tilstander, men omfatter også fremme av dyrets positive fysiske og mentale tilstand i dyreforsøk.

Tiltak som berører "Refinement" bygger ofte på antagelser om hva som må antas å være stressende og smertefullt for en fisk. Kunnskapen om hva som stresser fisk og hvordan fisken opplever smerte er beskjedne. Enda mindre må kunnskapen kunne sies å være om forhold som bidrar til økt velferd for forsøksfisk. Det er imidlertid enkelte prosedyrer som utvilsomt er forbundet med stress og smerte (som for eksempel håndtering og blodprøvetaking). Når slike prosedyrer inngår i forsøket er det "lett" å ta forholdsregler for å minimere belastningen for fisken ved bruk av for eksempel anestesi. Det er imidlertid de andre mindre opplagte faktorer i en forsøksprotokoll som kan påføre fisken ulik grad av ubehag som skaper bekymring. Slike ukjente faktorer vil bidra til å redusere presisjonen til resultatene fra forsøk. Implementering av "Refinement" har derfor et betydelig potensial mht å oppnå gode og troverdige resultater.

Overvåking av fiskens velferdsstatus i forsøk er i stor grad begrenset til atferdsobservasjoner. Bidrag for å bedre fiskens velferd er stort sett basert på hvordan fiskens atferd endres basert på manipulering med forsøksbetingelsene. I noen forsøk måles stressparametere i blodet for å kartlegge fiskens velferd.

Fisk har en kompleks og sammensatt atferd utover hvordan de benytter vannsøylen og responderer på plutselige farer. Det bør derfor være mulig å utvikle metoder for bedre evaluering av fiskens velferd i forsøk, basert på mer komplekse atferdsobservasjoner. Det vil imidlertid kunne være store begrensninger i bruken av slike modeller i kar, som ikke er representative for den plassen fisken ville ha benyttet i naturlige omgivelser. I så måte vil enkel miljøberikelse kunne bidra til økt trivsel og en mer positiv assosiert atferd. Miljøberikelse kan for eksempel være enkle skjul, farge, struktur og farge på kar og sandbunn. I spesielle forsøk kan miljøberikelsen redusere annen eksperimentell eksponering som stresser fisken. Kanylert fisk svømmer rundt med en slange kveilet opp på hodet. Innfangning av denne fisken for blodprøvetaking vil bidra til økt stressrespons samt fare for å skade fisken i området den er kanylert. Et rør lagt på bunnen av karet vil være et naturlig tilfluktssted for fisken. Et langsgående hull i toppen på dette tilfluktsrøret gjør det mulig å fange opp kanyleslangen og ta en blodprøve uten å måtte fange og anestesere fisken.

9 Konklusjoner og anbefalinger

Denne utredningen har evaluert tilgjengelig kunnskap innen sentrale felt av betydning for fisk i forskning som miljø, velferd, smerte, smertebehandling og vaksineutvikling, og identifisert forskningsbehovet innen disse temaene. Her følger en sammenfatning av utvalgets viktigste konklusjoner og anbefalinger vedrørende forskningsmål innen: miljø, velferdsindikatorer, stress, smerte, smertelindring, og vaksineutvikling etterfulgt av en oppsummerende liste for de ulike feltene.

9.1 Miljø

Et av de største bidragene til de 3-R-ene for fisk i forskning vil være en harmonisering av miljøet for de artene som benyttes i forskning i dag. Vann er et komplekst og dynamisk miljø og endringer i en vannparameter kan resultere i betydelige endringer i den samlede vannkvaliteten. Et miljø som er tilpasset art, livsstadium og evt. årstid er avgjørende for gode og pålitelige resultater. Unøyaktige og upålitelige forskningsresultater som følge av ugunstige miljøbetingelser er ikke i samsvar med verken lovgivning eller god forskningsetikk.

Miljøforhold for sebrafisk er allerede godt beskrevet, med et potensial til å redusere antall fisk i forskning ved etablering av sebrafiskmodeller som kan besvare problemstillinger i flere fiskearter.

I store trekk bør forskning innen effekten av miljø på fisk i forskning fokusere på:

- Effekt av temperatur på fiskens biologi og vannmiljø.
- Vannbehov, plassbehov og andre miljøforhold for fisk i forsøk.
- Vannbehandling og forsøk med fisk i resirkuleringsystemer.
- Miljøberikelse.
- Harmonisering/standardisering av karmiljø.
- Skalering av forsøksenheter.
- Gruppestørrelser og sosialt miljø.
- Sebrafisk som modell i akvatisk "translasjonell" forskning.

9.2 Velferdsindikatorer

Det er et stort behov for økt kunnskap om harmoniserte velferdsindikatorer til bruk i overvåking av fisk i forsøk. Etablering av gode velferdsindikatorer vil bidra til å optimalisere forsøksbetingelsene forsøksfisk eksponeres for. Positive og negative velferdsindikatorer bør ideelt sett kunne måles indirekte uten å måtte interferere med fisken. Det er allikevel viktig å etablere velferdsindikatorer som baserer seg på individ og gruppeobservasjoner. For de individbaserte velferdsindikatorer er det ønskelig med økt kunnskap på ytre anatomiske og indre fysiologiske velferdsindikatorer. Forskningsbehovet innen velferdsindikatorer bør fokusere på å:

- Etablere, identifisere og validere velferdsindikatorer i forhold til art, kjønn, livsstadie, årstid og miljø med vekt på metoder som ikke interfererer med fisken.
- Etablering av standardiserte metoder som velferdsindikatorer, basert på produksjonsegenskaper og helsestatus.
- Etablere kunnskap om individ og gruppebaserte atferdsmønstre i forhold til art og miljø.
- Etablere metoder for identifisering av ytre velferdsindikatorer basert på fiskens utvikling, misdannelser, kroppsform, finneslitasje, skjelltap og slimlagets status.
- Etablere metoder for identifisering av indre velferdsindikatorer som stresshormoner, telemetriovervåking og måling av stresshormoner i utløpsvann.

9.3 Smerte

Det er faglig grunnlag for å anta at fisken har evne til nosisepsjon og opplevelse av smerte, men spørsmålet om fiskens evne til smerteopplevelse er omstridt. Det er derfor behov for bedre basalbiologisk forståelse av fiskens evne til å tolke nosisepive signaler. Kunnskap om fiskens evne til å tolke nosisepsjon som smerte vil ha stor betydning både for optimalisering av forsøksbetingelsene for fisken, og ikke minst fiskerinæringen. De viktigste forskningsområdene innen nosisepsjon og smerteopplevelse til fisk er:

- Bedre forståelse av fiskens smertereaksjon, mulighet for behandling (analgesi) og evaluering av "gamle" og "nye" anestesimiddel og deres effekt.
- Bedre forståelse av fiskens stressrespons gjennom å etablere forståelse av akutte og kroniske stressresponser i forhold til art, miljø og livsstadie og betydningen av positivt stress i fiskeforsøk.
- Bedre forståelse av betydningen av det eksperimentelt påførte stresset, og etablering av harmoniserte dietter/forsøksfôr, håndteringsrutiner, blodprøvetaking og eksperimentell intervensjon.
- Identifisere parametere i vann, blod og atferd som dyrevelferdsmessig forsvarlig endepunkt med hensyn til art, utviklingsstadium og type forsøk, og avklare forhold mellom negative velferdsindikatorer og dyrevelferdsmessig forsvarlige endepunkt.

9.4 Smertelindring

Det er behov for en bedre kunnskap og forståelse av fiskens smerteopplevelse og hva fisk opplever som smertefullt for, om mulig, å lindre smerteopplevelsen. For å etablere metoder for smertelindring av fisk er det nødvendig å studere følgende punkt:

- Karakterisere hva som er, og hva som ikke er, smertefullt for ulike fiskearter.
- Metoder for skånsom og effektiv smertelindring.
- Effekt av smertelindring.
- Doseringer for ulike fiskearter-/individer.
- Grunnleggende kunnskap om hvor og hvordan de mest aktuelle smertelindrende midlene virker (mekanismer; bl.a. viktig for valg av rett middel for gitt forsøksdesign).
- Effekt av akutt smertebehandling.
- Effekt av kronisk smertebehandling.

- Er smerteopplevelsen påvirket av temperatur/miljø.

9.5 Vaksineforskning

Det benyttes i dag et stort antall fisk i vaksineutvikling, mye på grunn av krav fra myndighetene for dokumentasjon før godkjenning av vaksiner. De velferdsmessige konsekvensene av vaksineforsøk er en avveining mellom økt sykdomsmotstand og bivirkninger som følge av vaksinasjonen. Ved stikkvaksinering, som er den vanligste formen for vaksiner, utsettes fisken for betennelse i bukholen og det er forekomster av virveldeformasjoner i ryggstøylene og melanin deponering i bukvegg og i muskulatur. Vaksineforsøkene påvirkes av flere faktorer, og da spesielt temperatur og fiskestørrelse. For å bidra til ytterligere implementering av de 3-R-ene i vaksineforskning bør følgende områder prioriteres:

- Miljøeffekt - I fisk er individvariasjonen og miljøvariasjonen stor. For mus finnes en "Specific Pathogen Free" (SPF) mus som gjør at antallet dyr i forsøk kan reduseres betydelig. Det bør kunne utvikles spesielle forsøksdyrlinjer for laks (f.eks klonete, innavla eller SPF linjer) som kunne vært brukt innledningsvis i vaksinstudiene. Disse kunne gi mer spesifikke svar og redusere behovet for forsøksdyr i feltstudiene.
- Standardisering - De europeiske pharmacopoeia monografiene må videreutvikles/forbedres med tanke på å redusere antallet forsøksdyr. Eksempelvis så er det allment kjent at effekttesten som er beskrevet i furunkulose monografien ikke gir tilfredsstillende svar. Den gjennomføres allikevel fordi den er et myndighetskrav, men gjøres i tillegg til andre tester.
- Utvikling av nye vaksinekonsepter med minimale bivirkninger.

9.6 Andre områder av betydning

9.6.1 Felles database over miljøparametere på gjennomførte fiskeforsøk

Den vitenskapelige verdien av et fiskeforsøk er, som nevnt i denne rapporten flere ganger, i stor grad bestemt av forsøksmiljøet under hele forsøket. Det er derfor viktig at man allerede under planleggingen av et nytt fiskeforsøk har en god forståelse for hvordan ulike miljøforhold vil kunne påvirke fisk i forsøket. For å bidra til å redusere antall fisk som brukes i forskning bør det tilrettelegges for bedre tilgang på bakgrunnsinformasjon om miljøforholdene under gjennomførte og avsluttede forsøk. Relevant informasjon om forsøksbetingelser bør derfor gjøres tilgjengelig i en søkbar database. Drifting av en slik database bør gjennomføres av et forvaltningsorgan, men struktur og utforming bør være forskerinitiert.

En slik database vil også danne et grunnlag for en forbedring av de matematiske modellene som ligger til grunn for beregning av antall fisk som benyttes i et forsøk. Det er i dag ingen lett tilgjengelige og gode matematiske modeller for beregning av gruppestørrelser i fiskeforsøk. En systematisering av gjennomførte forsøk med resultater knyttet opp til miljøparametere i en sentral database vil kunne bidra til etablering av matematiske beregningsmodeller tilpasset sentrale miljøparametere og fiskeart for å bedre kunne estimere behovet for antall fisk i hvert forsøk.

Etablering og drifting av en slik database med mulighet for å optimalisere forsøk i planleggingsfasen bør utredes.

9.6.2 Formidling til og utdanning av forskere

Fisk representerer et viktig forsøksdyr i norsk forskning, og forskere er forpliktet gjennom Dyrevernsloven, Forskrift om forsøk med dyr og Forskningsetiske retningslinjer for naturvitenskap og teknologi å ta i bruk de 3 R-ene i alle forsøkets faser, fra planlegging, gjennomføring og til publisering. Det innebærer at forskere og forskningsmiljøene blir godt skolert i de 3-R-ene. Det finnes i dag ikke noe kvalitetssikret kursmateriell i forsøksdyrlære for fiskeforskere. Forsøksdyravdelingen på Norges Veterinærhøgskole har et kompendium for fiskeforskere som nå er modent for en betydelig revisjon og oppdatering. Det er derfor behov for et nytt kompendium i forsøksdyrlære for forskning med fisk, gjerne på engelsk, for i fremtiden å styrke utdanningen av de forskningsmiljøene som benytter fisk i sin forskning. Dette vil være et tids- og resurskrevende arbeid og kreve bidrag fra flere av forskningsmiljøene i Norge. Utover direkte forskningsstøtte bør Forskningsrådet stille midler til rådighet for utarbeidelse av et kompendium/bok innen forsøksdyrlære for fiskeforskere med en fast redaksjon med ansvar for regelmessig oppdateringer av innholdet.

10 Kostnadsoverslag

I følge mandatet skal gruppen også antyde kostnadene ved gjennomføring av de forskningsbehov som er identifisert i utredningen. Dette er komplekse forskningsbehov forbundet med betydelig tverrfaglig interaksjonsmuligheter. En samlet forskningsinnsats vil beløpe seg til rundt 57 mill kroner årlig i en periode over fire år oppsummert i Tabell 10.1 til slutt i kapitlet. Det er mulig å redusere disse kostnadene ved å inkludere denne forskningsaktiviteten i pågående og fremtidige forskningsprogram fra Forskningsrådet.

Forskningsrådet bør uansett, i lys av de 3-R-ene, vektlegge godt tverrfaglig samarbeid ved tildeling av forskningsmidler innen de forskningsområdene rapporten har identifisert og koble områdene opp mot andre relevante forskningsprogram fra Forskningsrådet. Det bør også være åpning for at Forskningsrådet i tildelinger innen relevante forskningsprogram stiller krav til at det gjennomføres relevante forsøk skissert i denne rapporten.

10.1 Prioriteringer

Formålet med forskning på fisk i forskning bør i hovedsak være å etablere harmoniserte miljøbetingelser og gode velferdsindikatorer som bidrar til å styrke kvaliteten på forskningen for så å redusere antall fisk som brukes i forskning i dag. Videre er det viktig med en bedre forståelse av fiskens stress og evne til å oppleve smerte og kunnskap om anestesi og smertelindring.

10.1.1 Miljøkrav

Temperatur - Siden fisk er vekselvarme dyr og flere av fiskens miljøparametere er temperaturavhengige, er temperatur den miljøparameteren som kanskje har størst betydning for fisken sin velferd ved harmonisering av forsøksmiljøet. Forskning som belyser effekten av temperatur på miljøparameter og i forhold til de andre temaene belyst i denne utredningen, som velferdsindikatorer, stressrespons, smertebehandling og vaksineutprøving vil være et viktig bidrag til implementering av de 3-R'-ene i forskning på fisk.

Vannbehov og miljøforhold/vannkvalitet - Vann er en begrensende resurs i flere av forsøksdyranleggene og det er ønskelig med en bedre forståelse av forholdet mellom vannbehov og miljøforhold spesielt med hensyn til harmonisering av forsøksbetingelsene for de ulike fiskeartene som benyttes i forskning i dag. Differansen i oksygeninnhold mellom innløp og avløp (d-verdi) blir sett på som et viktig mål for belastning av vannkvaliteten. D-verdien kan derfor være et godt mål på vannmiljøet og en viktig parameter i standardiseringen av vannmiljøet i replikatene i et forsøk. Forskning på etablering av RAS foreslås å koordineres sammen med vannbehov og miljøforhold/vannkvalitet, da det er flere identiske problemstillinger mellom disse feltene.

Miljøberikelse og standardisering - De ulike fiskeartene som benyttes i norsk forskning i dag har i naturen svært forskjellige miljøpreferanser. Hvorvidt oppstalling av fisk i kar med glatte

og ensfargede eller gjennomsluktige overflater nesten utelukkende beregnet på oppdrett påvirker fiskens velvære er stort sett ukjent. Det behov for omfattende forskning som belyser fordeler og ulemper med miljøberikelse og muligheten for å harmonisere kar i forhold til fiskeart som benyttes i forskningen. Sentralt er også hvordan ulemper kan forebygges eller reduseres. Denne forskningen vil i stor grad måtte støtte seg på bruk av velferdsindikatorer og målinger av stressparametere og bør derfor koordineres i forhold til forskningsaktivitet innen disse fagfeltene.

Til forskning på miljøparametere til fisk i forskning bør det derfor i kommende 4-års-periode bevilges minst 21 mill kroner fordelt på temperatur (10 mill), vannbehov og miljøforhold/vannkvalitet (7 mill), og miljøberikelse og standardisering av kar (5 mill).

10.1.2 Sebrafisk

Sebrafisk er i dag en etablert art i norsk forskning med godt karakteriserte miljøbehov gjennom 30 års intens forskning og derigjennom standardisering. Det er derimot et opplagt behov for å styrke kunnskap om overføringsverdi fra forsøk på sebrafisk til de andre fiskeartene man benytter i norsk forskning i dag. Økt bruk av sebrafisk for pilot og "translasjonelle" studier vil utgjøre et betydelig bidrag til de 3-R-ene, og bør støttes med midler i størrelsesorden 6 millioner over en 4 års periode.

10.1.3 Velferdsindikatorer og stress

Det er et stort behov for å kartlegge positive og negative velferdsindikatorer på fisk som benyttes i norsk forskning i dag. De velferdsindikatorerne som benyttes i dag begrenser seg i stor grad til adferdsobservasjoner og det er behov for nye objektive indikatorer på miljø, gruppe og individnivå. Forskning på velferdsindikatorer bør også evaluere hvorvidt det er mulig å tilrettelegge for artstilpassede systemer for evaluering av velferd hos forsøksfisk. Velferdsindikatorer bør også undersøkes i lys av alle de andre forskningsområdene beskrevet i denne utredningen. Det vil være resurskrevende å etablere gode velferds-kriterier for de ulike artene som brukes i norsk forskning i dag, og det bør derfor avstettes 10 mill til dette formålet i en 4-års periode.

10.1.4 Smerte og smertelindring

Det er etter hvert enighet om at fisk har evnen til nocisepsjon, men det råder uenighet om hvorvidt fisken er i stand til å tolke disse nervesignalene som smertefulle. Så lenge det hersker tvil om hvorvidt fisken opplever smerte vil "føre var prinsippet" gjelde i alle forsøkssammenhenger som er forventet å være forbundet med smerte. Over en 4 års periode bør det bevilges 6 mill for å bidra til bedre forståelse av fisken sin evne til å oppleve smerte og mulighet for anestesi og smertebehandling.

10.1.5 Vaksineutvikling og fiskevelferd

Det benyttes i dag et stort antall fisk i vaksineutvikling, mye på grunn av krav fra myndighetene for dokumentasjon før godkjenning av vaksiner. De velferdsmessige konsekvensene av vaksineforsøk er en avveining mellom økt sykdomsmotstand og

bivirkninger som følge av vaksinasjonen. Ved stikkvaksinering, som er den vanligste formen for vaksinering, utsettes fisken for betennelse i bukhalen og det er forekomster av virveldeformasjoner i ryggspylen og melanin deponering i bukvegg og i muskulatur. Vaksineforsøkene påvirkes av flere faktorer, og da spesielt temperatur og fiskestørrelse. I den kommende 4-års perioden bør det bevilges 8 mill for å bidra til å kartlegge effekt av etablering av en SPF forsøksdyrlinje for vaksinetesting og videreutvikling av de europeiske pharmacopoeia monografene.

10.1.6 Formidling

Et av de viktigste bidragene for å redusere fisk i forskning er grundig veiledning og opplæring av forskere og teknisk personale i disse disiplinene som omtales i denne rapporten. Det vil derfor være naturlig at det også benyttes midler til formidling av denne kunnskapen gjennom etablering av et engelskspråklig kurshefte/kompendium for forskning på fisk. En arbeidsgruppe på rundt 9 forskere bør ha ansvaret for dette kompendiet, og det må påregnes 1/3 årsverk fra hver forsker i tillegg til reiser og møter. Det foreslås at det bevilges 4-5 millioner kroner til etablering av et engelskspråklig kursmaterieell beregnet på fiskeforskere. Det bør stimuleres til samarbeid med andre nasjoner i dette arbeidet slik at kursmateriellet får størst mulig nytteverdi.

Tabell 10.1 Oppsummering av kostnadsoverslag til forskning innen miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk.

| Forskningsfelt | Delsum (mill NOK) | Sum (mill NOK) |
|--|----------------------|----------------|
| Miljøkrav | | |
| Temperatur | 10 | 22 |
| Vannbehov og miljøforhold/vannparametere | 7 | |
| Miljøberikelse og standardisering | 5 | |
| Sebrafisk | | 6 |
| Velferdsindikatorer og stress | | 10 |
| Smerte og smertelindring | | 6 |
| Vaksineutvikling og velferd | | 8 |
| Formidling | | 5 |
| Kostnadsoverslag totalt | | 57 |

11 Tilgjengelige rapporter av viktighet ved forskning på fisk

11.1 VKM rapporter

Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt

<http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=16679¶m5=read>

<http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=16665¶m5=read>

Fosterets evne til å oppleve ubehag, smerte og stress

<http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=16385¶m5=read>

<http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=15853¶m5=read>

Transportation of fish within a closed system

http://www.vkm.no/eway/default.aspx?pid=0&oid=-2&trg=__new&__new=-2:17842

Vurdering av fangst og hold av villtorsk (*Gadus morhua* L.)

<http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=15786¶m5=read>

11.2 EFSA rapporter

Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/ahaw_op_ej736_salmonwelfare_en,2.pdf?ssbinary=true

Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/ahaw_op_ej796_troutwelfare_en,0.pdf?ssbinary=true

Food Safety considerations of animal welfare aspects of husbandry systems for farmed fish - Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/biohaz_op_ej_867_fish_welfare_en.pdf?ssbinary=true

General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/ahaw_op_ej954_generalfishwelfare_en,0.pdf?ssbinary=true

Opinion on the "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes" The EFSA Journal (2005) 292, 1-46.

Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/opinion_ahaw_02_ej45_stunning_en.pdf?ssbinary=true

11.3 Andre rapporter, bøker og artikler

A Guide to Acceptable Procedures and Practices for Aquaculture and Fisheries Research, NSW Fisheries Animal Care and Ethics Committee

http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0010/114976/acceptable-aquaculture-and-fisheries-research.pdf

Endpoints Setting, Monitoring and Humane Termination for experiments using fish, University of Victoria, Animal Care Unit: Animals

<http://www.research.uvic.ca/ethics/SOPs/Aquatics/SOP%20Endpoints%20setting%20fish%20Dec%201%202007.pdf>

Dyrevelferd i akvatisk dyrehold – herunder fremtidens dyrehold, NIVA rapport LNR 5469-2007. ISBN 978-82-577-5204-0

Fish toxicology of Fishes, Di Giulio GT og Hinton DE, (2008) CRC Press, ISBN 978-0-4152-4868-6.

Fish Welfare, Branson E., Wiley-Blackwell, (2007) ISBN 978-1-4051-4629-6.

FISHERIES SOCIETY OF THE BRITISH ISLES BRIEFING PAPER 2, FISH WELFARE

<http://www.fsbi.org.uk/docs/brief-welfare-refs.pdf>

Forskningsbehov innen dyrevelferd i Norge, Norges Forskningsråd, (2005) ISBN 82-12-02156-4

Forskningsetiske retningslinjer for naturvitenskap og teknologi, De nasjonale forskningsetiske komiteer, ISBN 978-82-7682-054-6

Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research, Johansen et al., Lab Anim (2006) 40, 323–340.

Guidelines for the Use of Fishes in Research (2004)

http://www.fisheries.org/afs/docs/policy_guidelines2004.pdf

Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species, Williams et al., (2009) Lab Anim, 43:107-120

Kompendium i forsøksdyrlære for fiskeforskere, (1999) Trond Brattelid, Norges Veterinærhøgskole, ISBN 82-7725-116-5

Menneskets medfødte forutsetninger som vertskap for produksjonsdyr, Børresen, B i Dyreetikk, Føllesdal A (red) (2000) Fagbokforlaget.

Methods for fish biology, Schreck CB og Moyle PB, (1990) American Fisheries Society, ISBN 978-0-9132-3558-4.

Om lov om dyrevelferd, Ot.prp.nr. 15, Landbruks- og Matdepartementet, (2008).

Pain and Distress in Fish, Issue editor: Stephen A. Smith. (2009) ILAR Journal Vol. 50(4)

RSPCA welfare standards for farmed Atlantic salmon
<http://www.rspca.org.uk/servlet/>

Slaktesystemer for laksefisk i 2008 – fiskevelferd og kvalitet, Veterinærinstituttets rapportserie 01-2009.

The care and use of fish in research, teaching and testing (2005)
http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Fish/Fish_Guidelines_English.pdf

Welfare in farmed fish, Fiskeriforskning Report 5/2006. ISBN 13978-82-7251-578-1

Kontaktliste

Forsker Dr. Trond Brattelid, NIFES (leder)

Postboks 2029 Nordnes
5817 BERGEN
tbr@nifes.no

Cand Jur. Inger Helen Stenevik (sekretær)

Stenevik
6966 GUDDAL
ihstenevik@yahoo.no

Forsker Dr. Elisabet Forsgren, NINA

Tungsløtta 2
7485 TRONDHEIM
elisabet.forsgren@nina.no

Norecopa

Veterinærinstituttet
Postboks 750 Sentrum
0106 Oslo

**Forsker Tom Hansen,
Havforskningsinstituttet**

Matre Havbruksstasjon
59984 MATREDAL
tom.hansen@imr.no

**Forsker Dr. Øyvind Aas-Hansen, Nofima
Marin**

Postboks 6122
9291 TROMSØ
oyvind.aas-hansen@nofima.no

**Professor Dr. Sveinung Fivelstad, Høgskolen i
Bergen**

Institutt for akvakultur-, kjemi- og
bioingeniørfag
Postboks 7030
5020 BERGEN
sveinung.fivelstad@hib.no

**Seniorforsker Dr. Grete Bæverfjord, Nofima
Marin**

Institutt for akvakulturforskning
6600 SUNDALSØRA
grete.baverfjord@nofima.no

**Stasjonsveterinær Anne Ramstad, VESO
Vikan**

Vikan
7800 NAMSOS
anne.ramstad@veso.no

Om publikasjonen

«Fisk i forskning – miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk. En utredning av forskningsbehovet» er utarbeidet av et utvalg oppnevnt i samarbeid mellom Forskningsrådet og den Nasjonale plattformen for alternativ bruk av dyr i forskning (NORECOPA).

Utredningen angir forskningsbehov og prioriteringer om dyrevelferd hos fisk i forsøk og forskning for å redusere antall forsøksfisk, samt tiltak for å fokusere på prinsippene ved bruk av forsøksdyr i forskning om fisk.

Publikasjonen kan bestilles via internett:
www.forskningsradet.no/publikasjoner

Norges forskningsråd

Stensberggata 26
Postboks 2700 St. Hanshaugen
NO-0131 OSLO

Telefon: +47 22 03 70 00
Telefaks: +47 22 03 70 01
post@forskningsradet.no
www.forskningsradet.no

Utgiver:

© Norges forskningsråd
Havbruksprogrammet
www.forskningsradet.no/havbruk

Design: Design et cetera AS
Foto: Per Eide, Samfoto (øverste bilde)
NIFES (sebrafisk i kolbe og laksefisk)

Trykk: Allkopi
Opplag: 250

Desember 2009

ISBN 978-82-12-02726-8 (trykksak)
ISBN 978-82-12-02727-5 (pdf)