

Feltoppfølging av rognkjeks vaksinert mot
Aeromonas salmonicida A-lagstype V og VI

Helene Sæbjørnsen



Master i fiskehelse

Universitetet i Bergen

1. juni 2017

FORORD

Denne masteroppgaven er en del av profesjonsstudiet i fiskehelse hos Universitet i Bergen (UiB), ved det matematiske-naturvitenskapelige fakultet. Studiet har omfattet feltoppfølging av rognkjeks vaksinert mot *A. salmonicida* A-lagstype V og VI og *V. anguillarum* O1. Masteroppgaven var finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF), Vaxxinova Norway og Marine Harvest. Takk for økonomisk støtte til studiet.

Jeg vil rette en stor takk til mine to veiledere, Duncan J. Colquhoun ved UiB og Veterinærinstituttet Oslo, og Øyvind Brune Vågnes ved Vaxxinova Norway. Takk for din gode veiledning, faglige kunnskap og oppmuntrende holdning, Duncan. Selv om du har kontor i Oslo, har du svart på mail raskere enn lynet. Takk, Øyvind, for at døren til kontoret ditt alltid har stått åpen, for ditt gode humør, og for at du har tatt deg tid til å svare på alle lure og mindre lure spørsmål.

Til alle ansatte ved Vaxxinova Norway, deres herlige humor og engasjement har vært uvurderlig. Takk for all god hjelp underveis i laboratoriearbeidet og skriveprosessen. En spesiell takk til Kjersti Steinnes og Torill Vik Johannessen for veiledning i diagnostikkens verden.

Takk til anleggsansatte på settefiskanlegget og på sjølokaliteten i studiet. Takk til driftsleder Lars Tore Haugen for godt samarbeid. Takk til Henriette Glosvik og Unni Austefjord i Marine Harvest, som har delt av sin kunnskap om rognkjeks. Dere inspirerer.

Min gode medstudent, Henriette Nordstrand. Jeg er takknemlig for tiden vi har fått sammen dette året, for ditt store hjerte, din positivitet og ditt engasjement. Takk til jentene på lesesalen og til hele fiskehelsekullet, dere har vært en kontinuerlig glede de siste fem årene.

Til slutt vil jeg rette en stor takk til min nærmeste familie og svigerfamilie, øvrig familie og mine gode venner. Deres støtte og omsorg har vært dypt verdsatt.

Daniel, min elskede ektemann. En uendelig stor takk for den du er. Du er den største velsignelsen inn i livet mitt. Takk for at du har oppmuntret, heiet på, trodd på, bedt for, og tidvis båret meg gjennom dette året. Jeg gleder meg til å forandre verden sammen med deg.

Bergen, juni 2017

Helene Sæbjørnsen

SAMMENDRAG

Lakselusbekjempelse er en av de største utfordringene i oppdrett av atlantisk laks og bruk av rognkjeks som biologisk avlusning har økt betraktelig de siste årene. Dødelighet hos rognkjeks utgjør et stort problem etter utsett i sjø, og spesielt har bakterien *Aeromonas salmonicida* vært årsak til store sykdomsutbrudd og høy dødelighet (Nilsen et al., 2014). *A. salmonicida* A-lagstype V og VI er hyppigst påvist ved sykdomsutbrudd hos rognkjeks (Gulla, 2015, Bornø et al., 2016). Det jobbes kontinuerlig for å kartlegge og redusere dødelighet av rognkjeks og annen rensefisk. Vaksinerer er et viktig forebyggende tiltak mot sykdom og dødelighet. Vaksinerer av rognkjeks øker i omfang, men få kommersielle vaksiner er tilgjengelig.

Dette studiet tok for seg feltoppfølging av rognkjeks vaksinert mot *A. salmonicida* A-lagstype V og VI og *V. anguillarum* O1. Vaksinert (43g) og uvaksinert (47g) rognkjeks ble sjøsatt i laksemerder i midten av september 2016. Rognkjeksene ble prøvetatt to ganger før utsett i sjø, og tre ganger etter sjøutsett. Ingen sykdom eller patogener ble påvist før utsett. En forøket dødelighet inntrådte få uker etter utsett, og det ble påvist atypisk furunkulose hos begge rognkjeksgruppene. *A. salmonicida* ble påvist med sanntids RT-PCR av hodenyre- og gjellevev, bakteriedyrking og histologiske undersøkelser. Basert på diagnostiske undersøkelser ble det funnet at vaksinert rognkjeks ikke presterte bedre enn uvaksinert. Rognkjeksene ble sjøsatt i et pågående utbrudd med atypisk furunkulose hos villfanget leppefisk i anlegget, og faktorer som høyt smittepress, vanntemperatur på 16°C ved utsett, lav næringstilgang og sterk strøm medførte trolig et infeksjonspress som var høyere enn vaksinerens evne til beskyttelse. Hovedvekt av infeksjonen var A-lagstype VI, men det ble også påvist blandingsinfeksjon med A-lagstype V og VI hos rognkjeks i anlegget. MLVA-analyser viste at A-lagstype VI i studiet var forårsaket av minst åtte ulike smitteisolat. Fenotypisk testing av A-lagstype V og VI isolat fra studiet indikerte at biokjemiske tester fra API 20 NE kan differensiere mellom A-lagstype V og VI, men trengs ytterligere testing.

Identifisering av *Pasteurella* sp. hos én rognkjeks i anlegget indikerte at horisontal smitteoverføring kom fra vill rognkjeks, ettersom påvisning på settefiskanlegget var negativ. Det ble observert histologiske lever- og muskelforandringer med ukjent opprinnelse. Studiets udokumenterte dødelighet (svinn) utgjorde >60% av fisken i begge rognkjeksgruppene og indikerer at behovet for kartlegging og forebygging av svinn og dødelighet ved bruk av rognkjeks er stort.

SUMMARY

Efficient sea-lice control is still one of the most important challenges for the salmon farming industry, and use of cleaner fish as biological delousing has increased considerably in recent years. Mortality of lumpsucker poses a major problem after sea transfer, and the bacterium *Aeromonas salmonicida* has been the cause of major disease outbreaks and high mortality. A-layer types V and VI are most commonly detected in the diseased outbreaks of lumpsucker. Work is ongoing to map and reduce the mortality of lumpsucker and other cleaner fishes. Vaccination is an important preventive measure against disease and mortality, and vaccination against bacterial diseases is becoming more widespread in lumpsucker.

This study involved field monitoring of lumpsucker vaccinated against *A. salmonicida* A-type V and VI and *V. anguillarum* O1. Vaccinated (43g) and unvaccinated (47g) lumpsuckers were transferred to salmon cages in mid-September 2016. Lumpsuckers were sampled twice before sea transfer, and three times during the sea period. Both groups apparently healthy when transferred to sea. An increased mortality occurred a few weeks after sea transfer. Atypical furunculosis was identified in both vaccinated and unvaccinated lumpsucker, based on real-time RT-PCR of head kidney tissue and gill tissue, bacterial cultivation and histological examination of microcolonies consistent with *A. salmonicida*. It became apparent that vaccinated lumpsucker did not perform better than the unvaccinated fish. The lumpsucker were transferred to sea during an ongoing outbreak of atypical furunculosis in wild-caught wrasse in the facility, and factors such as high infection pressure, high water temperature, poor nutritional status and strong currents probably led to environmental conditions and an infection pressure higher than the vaccine possibly could protect against. The infection was dominated by A-layer type VI, but co-infections with A-layer type V and VI were seen in lumpsucker. MLVA analyses showed that A-layer type VI infections were probably caused by at least eight different strains. Phenotypic testing indicated that biochemical tests from API 20 NE can differentiate between A-layer type V and VI, but further testing is needed.

Identification of *Pasteurella* sp. in one of the lumpsuckers in the sea facility indicated that horizontal transmission of infection came from wild lumpsucker, as the detection of the pathogen from the hatchery was negative. Histological liver and muscle changes of unknown aetiology were observed during the study. The study's undocumented mortality accounted for >60% of the fish in both groups of lumpsucker. This indicates a further need for mapping and prevention of mortality in use of lumpsucker used as a cleaner fish.

FORKORTELSER

AGD	Amoebic gill disease
A-lag	Additional layer protein (virulensfaktor for <i>A. salmonicida</i>)
A ⁺	A-lagspositive
A ⁻	A-lagsnegative
BA	Blodagar (0,5% NaCl)
BAS	Blodagar med salt (2,5% NaCl)
bp	Basepar
CBB	Coomassie Brilliant Blue agar
Ct	Cycle Threshold
DNA	Deoxyribonuclease syre
ILA	Infeksiøs lakseanemi
IPN	Infectious pancreas necrosis
LPS	Lipopolysakkarid
MLVA	Multilocus variable number tandem repeat analysis
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PD	Pancreas disease
RNA	Ribonuclease syre
RT-PCR	Revers transkriptase polymerasekjedereaksjon
Sanntids RT-PCR	Sanntids Revers Transkriptase Polymerasekjedereaksjon
SGR %	Specific growth rate %
sp.	Arter (entall)
spp.	Arter (flertall)
subsp.	Subspeices (entall)
V/(V)	Vaksinert rognkjeks
<i>vapA</i>	Virulens protein (gen)
VNTR	Variable number of tandem repeats
U/(UV)	Uvaksinert rognkjeks

INNHOLDSFORTEGNELSE

FORORD	II
SAMMENDRAG	III
SUMMARY	IV
FORKORTELSER	V
INNHOLDSFORTEGNELSE	VI
1 INTRODUKSJON	1
1.1 NORSK OPPDRETTSNÆRING	1
1.2 RENSEFISK SOM BIOLOGISK AVLUSNING	2
1.3 ROGNKJEKS (<i>CYCLOPTERUS LUMPUS</i>)	4
1.3.1 Sykdom hos rognkjeks	5
1.4 <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i>	7
1.4.1 A-lag og virulens	9
1.5 IMMUNSYSTEMET HOS TELEOSTER	9
1.5.1 Immunsystemet hos rognkjeks	11
1.6 VAKSINERING AV FISK	11
1.6.1 Vaksineformulering og administrering	12
1.6.2 Vaksinerings av rognkjeks	13
1.6.3 Vaksinebivirkninger	14
1.7 DYREVELFERD	14
1.8 MÅL MED STUDIET	15
2 METODE OG MATERIALE	16
2.1 FISK INKLUDERT I STUDIET	16
2.1.1 Vaksinen og vaksinerings	16
2.2 ANLEGGET, DRIFTSRUTINER OG MILJØFORHOLD	17
2.3 DØDELIGHET	18
2.4 PRØVEUTTAK	18
2.4.1 Vekt	20
2.4.2 Bakteriestryk	20
2.4.3 Uttak av PCR-prøver	20
2.4.4 Uttak til histologi	20
2.4.5 Vaksinebivirkninger	21
2.5 ANALYSERING AV PRØVEMATERIALE	21
2.5.1 Fenotypisk karakterisering av sekundærkulturer	21
2.5.1.1 Fenotypisk typing	22
2.5.2 Samtids RT-PCR	22
2.5.2.1 Genotypisk A-lagstyping	24
2.5.3 MLVA	24
2.5.4 16S rRNA-sekvensering	25
2.5.5 Histologi	26

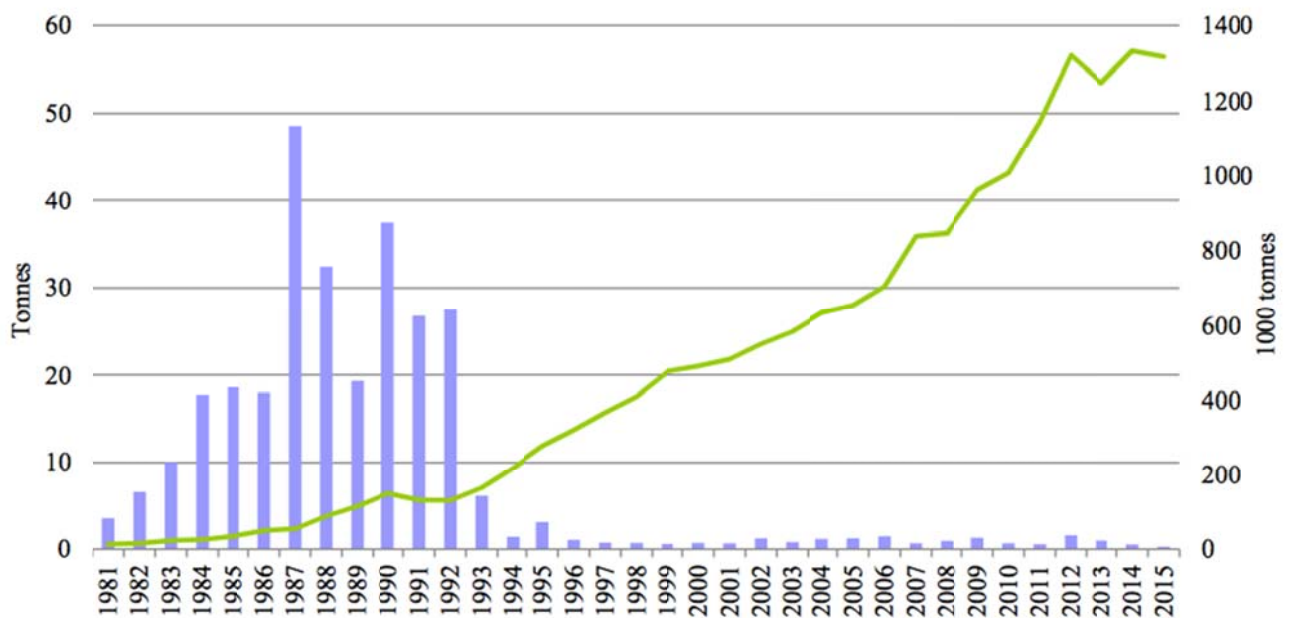
3 RESULTAT	27
3.1 DØDELIGHET HOS ROGNKJEKS.....	27
3.2 VEKT	28
3.3 KLINISK UNDERSØKELSE	29
3.4 DIAGNOSTISERING AV <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i>	31
3.4.1 Fenotypisk typing og genotypisk A-lagstyping av bakterieisolat.....	31
3.4.2 Sanntids RT- PCR av hodenyre- og gjellevev.....	33
3.4.3 MLVA	36
3.4.4 Histologi	37
3.5 VAKSINEBIVIRKNINGER	39
3.6 ANDRE FUNN.....	40
3.6.1 Bakteriedyrking.....	40
3.6.2 Histologi	40
3.7 MILJØ- OG DRIFTSOBSERVASJONER	42
3.8 VILLFANGET LEPPEFISK	42
4 DISKUSJON	43
4.1 ATYPISK FURUNKULOSE OG DIAGNOSTISERING AV <i>AEROMONAS SALMONICIDA</i>	43
4.2 DØDELIGHET OG SMITTEPRESS	46
4.3 EFFEKT AV VAKSINE.....	48
4.4 ANDRE FUNN.....	49
4.5 UDOKUMENTERT SVINN	49
5 KONKLUSJON	50
6 FREMTIDSPERSPEKTIVER.....	51
7 LITTERATURLISTE.....	52
APPENDIKS.....	59
APPENDIKS 1: VAKSINEBIVIRKNINGER.....	60
APPENDIKS 2: MASTERMIKS.....	61
APPENDIKS 3: MILJØMÅLINGER	62
APPENDIKS 4: VEKT	64
APPENDIKS 5: PRØVEUTTAK I SJØ	66
APPENDIKS 6: DØDELIGHET	77
APPENDIKS 7: API 20 NE OG API 20 E.....	78

1 INTRODUKSJON

1.1 NORSK OPPDRETTSNÆRING

Fra den spede begynnelse på 1960-tallet, ble det i 2015 solgt 1,3 millioner tonn atlantisk laks fra Norge, med en verdi på 44, 3 milliarder norske kroner (SBB, 2016). Laks utgjør den største akvakulturarten i Norge, men det drives også oppdrett av regnbueørret, røye, kveite, torsk og skalldyr (SBB, 2016). I tillegg har oppdrett av rognkjeks og berggyllt vokst fram de senere årene (Bornø & Lie Linaker, 2015).

Under alle former for intensiv kultivering, der en eller flere arter opptrer med unaturlig høy tetthet, er overføring av infeksjose patogener mellom individer en større utfordring enn i det naturlige miljøet (Sommerset et al., 2005). På 1980-tallet opplevde norsk laksenæring store tap som følge av bakterielle sykdommer, hovedsakelig klassisk vibriose (*Vibrio anguillarum*), kaldtvannsvibriose (*Vibrio salmonicida*) og furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) (Egidius et al., 1986, Myhr et al., 1991, Johnsen & Jensen, 1994, Sommerset et al., 2005). Store mengder antibiotika ble brukt for at næringen ikke skulle kollapse, og vaksiner ble et viktig tiltak for videre vekst (figur 1.1) (Sommerset et al., 2005, Berg et al., 2006).



Figur 1.1 Forbruket av antibiotika (tonn), og biomasse slaktet fisk (1000 tonn) i tidsperioden 1981-2015 (NORM/NORM-VET, 2015).

Utfordringer med lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) eskalerte etter oppdrettsnæringens begynnelse (Heuch et al., 2005). Lakselus forårsaker store velferdsproblemer og økonomiske tap, og er regnet som det mest alvorlige patogenet for oppdrettet og vill atlantisk laks (Finstad et al., 2000, Torrissen et al., 2013, Imsland et al., 2014). *L. salmonis* forekommer naturlig i sjøvann, er utbredt på hele den nordlige halvkule, og tilpasset en livssyklus med lav vertstetthet (Torrissen et al., 2013). Høy vertstetthet grunnet oppdrett, har gitt økt prevalens og utbredelse av lakselus hos de ville og oppdrettete slektene *Salmo* spp. (atlantisk laks og brunørret), *Oncorhynchus* (stillehavslaks) og *Salvelinus* (røyer) i sjøvann (Heuch et al., 2005, Torrissen et al., 2013). Lakselus beiter på vertens slim, hud og blod, og avhengig av lusens livsstadium påføres verten fysiologiske og patologiske skader som osmotisk stress, økt kortisolnivå, og enklere inntrengningsmuligheter for mikroorganismer (Wootten et al., 1982, Finstad et al., 2000, Torrissen et al., 2013). Salinitet og temperatur virker inn på lusens utvikling og prevalens (Johnson & Albright, 1991, Heuch et al., 2009).

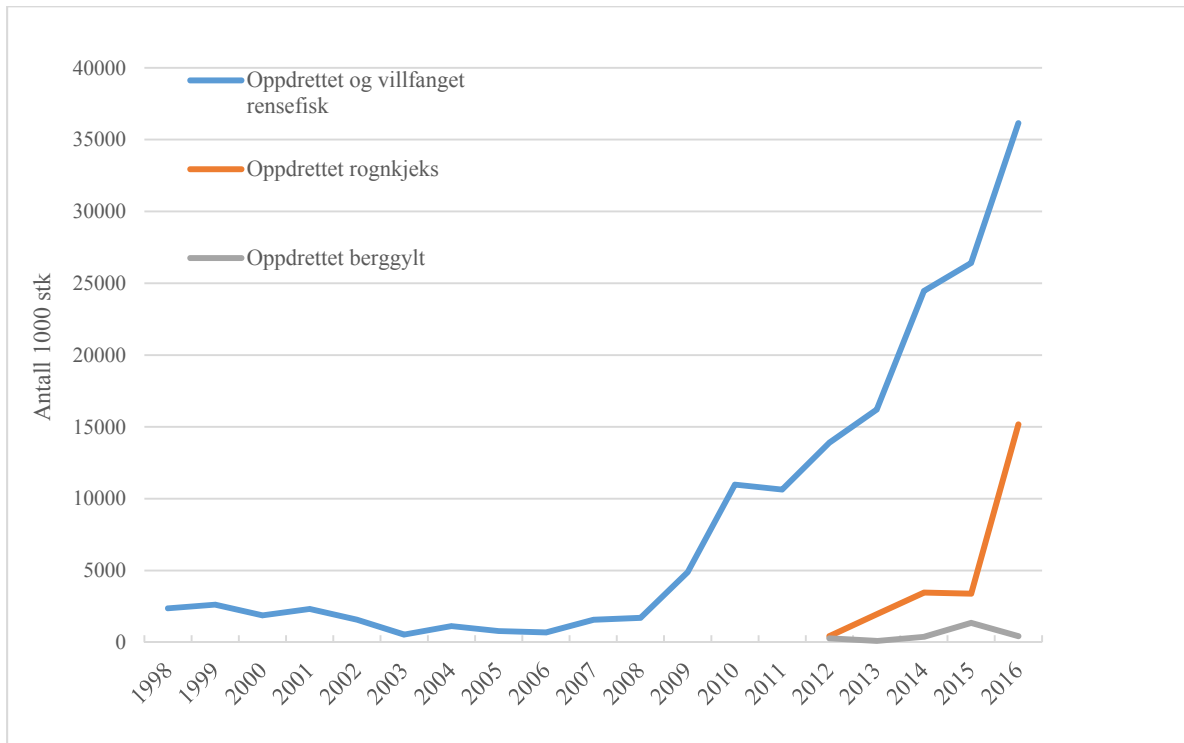
Lakselus blir behandlet med kjemisk, biologisk eller mekanisk avlusning, eller en kombinasjon av disse. Kjemisk avlusning kan gis innblandet i fôret (flubenzuroner og emamektinbenzoat) eller som badbehandlinger (hydrogenperoksid, organofosfater og pyretroider). Mekaniske metoder som børsting, spyling, ferskvann, laser eller oppvarmet vann har blitt mer aktuelle de senere årene, men er rapportert å gi betydelig dødelighet grunnet sår og skader på laksen (Hjeltnes et al., 2017). Økt forbruk av kjemiske lakselusmidler førte til resistensutvikling, og bruk av rensefisk som biologisk avlusning har derfor eskalert (Folkehelseinstituttet, 2016).

1.2 RENSEFISK SOM BIOLOGISK AVLUSNING

Betegnelsen ”rensefisk” brukes i norsk oppdrett om arter av leppefisk, og rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) (Nilsen et al., 2014). Rensefisker fungerer som effektive lusebeitere (Bjordal, 1991, Imsland et al., 2014). Av leppefiskartene brukes hovedsakelig berggyllt (*Labrus bergylta*), gressgyllt (*Centrolabrus exoletus*), grønngyllt (*Symphodus melops*) og bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*) (Johansen et al., 2016). En innblanding på 2-15 % rensefisk/laks er anbefalt (Lusedata.no, 2017).

Etterspørselen av rensefisk er økende, og i 2016 ble over 36 millioner oppdrettete og villfangete rensefisk satt ut, til en verdi tilsvarende 633 millioner kroner (figur 1.2) (Fiskeridirektoratet, 2017b). All rognkjeks benyttet som rensefisk er oppdrettet, mens bare en

prosentandel av all leppefisk er oppdrettet (berggyllt), resten er villfanget. Salg av oppdrettet rognkjeks var i 2016 over 15 millioner, en økning fra 3,5 millioner i 2014 (Fiskeridirektoratet, 2017a).



Figur 1.2 Antall rensfisk brukt til lakselusbekjempelse i Norge fra 1998-2016 omfatter både villfanget og oppdrettet rensfisk (leppefisk og rognkjeks), og produksjonen av oppdrettet rognkjeks og berggyllt har økt de siste årene (Fiskeridirektoratet, 2017a, Fiskeridirektoratet, 2017c)

Villfanget rensfisk kan fraktes så langt som fra Østersjøen til Nordland, og bestandsforvaltning og sykdomsintroduksjon er en aktuell problematikk, siden man ikke tilstrekkelig kjenner korrelasjonen mellom patogener hos rensfisk og laks, og introduksjon av patogener til nye områder kan oppstå (Bornø & Gulla, 2016, Haugland et al., 2016, Johansen et al., 2016).

Høy dødelighet av villfanget og oppdrettet rensfisk er observert etter utsett i laksemerder, og en omfattende rapport viser et minimumstall for dokumentert dødelighet på 33 % samlet for rensfisk, og 48% hos rognkjeks (Nilsen et al., 2014). Rapporten antok derimot at dødeligheten kunne være det dobbelte. På tross av høy dødelighet er det ingen tegn til reduksjon i produksjon eller bruk av rensfisk, men statistikken viser en stadig økende næring (figur 1.2). Bakterielle problem syntes å være den største utfordringen for dødelighet hos

rensefisk, og mangel på vaksiner, vaksinereregimer, skjul, fôringsrutiner og kunnskap om røkting er av betydning (Nilsen et al., 2014, Bornø et al., 2016, Bornø & Gulla, 2017).

I oppdrett er rognkjeksen blitt aktuell som rensefisk ettersom den spiser lakselus, og viser en større toleranse for lave temperaturer enn leppefiskartene (Imsland et al., 2014). I tillegg kan rognkjeksen begynne direkte på tørrfôr og vokser raskt (Imsland et al., 2014).

1.3 ROGNKJEKS (*CYCLOPTERUS LUMPUS*)

Familien Cyclopteridae omfatter fisker i slektene rognkjeks og ringbuker, og i norske farvann finnes ti arter, blant annet rognkjeks (*C. lumpus*) (Pethon & Nyström, 1998). Rognkjeks er naturlig utbredt i den boreale sonen på begge sider av Nord-Atlanteren, og er observert på et større antall breddegrader langs kysten av Amerika, enn i Europa (Davenport, 1985). Rognkjeks har en rund kropp med tykk hud, sju rekker med benknuter på buken og sidene, og en sugeskål med 16 fordypninger i ytterringen (Pethon & Nyström, 1998). Rognkjeks mangler svømmeblære, men har en tetthet som er lavere enn andre sammenlignende teleoster uten svømmeblære, feks tangkvabbe (*Blennius pholis*), gapeflyndre (*Hippoglossoides platessa*) og rødspette (*Pleuronectes platessa*) (Davenport & Kjørsvik, 1986).

Rognkjekshannen kalles rognkall, og betegnelsen rognkjeks er egentlig kun beskrivende for hunnen. I denne oppgaven vil rognkjeks bli brukt om begge kjønn med mindre annet er spesifisert. Rognkjeks kan trolig bli 15 år, og oppnå en størrelse på 63 cm og 8,1 kg (Wienerroither et al., 2011, s.128). Hunnen blir større enn hannen, men hannen utvikler større hode, sugeskål og brystfinner (Davenport, 1985, Pethon & Nyström, 1998). Under gyttiden blir rognkallens buk rødlig, mens hunnene forblir grønnaktig (Davenport, 1985, Goulet et al., 1986, Pethon & Nyström, 1998). Hunnen gyter porsjonsvis opptil 220 000 egg (1,6-2,7mm i diameter), etterfulgt av ytre befruktning (Goulet et al., 1986, Wienerroither et al., 2011, s.128). Eggene blir klebrig i kontakt med sjøvann, og danner klumper som hannen vokter i 6-10 uker (Davenport, 1985). Etter ett til to år migrerer juvenile rognkjeks til åpent hav, blir kjønnsmoden to til fire år senere, og trekker mot grunnere farvann for å gyte (Wienerroither et al., 2011, s.128).

Fra naturen er arten kjent å spise krepsdyr og maneter (Sæle, 2017). Lite næringsrelatert

forskning er gjennomført, men i merd er det observert at rognkjeks er opportunistisk i matveien, og nyttiggjør seg av tilgjengelig fôr (Imsland et al., 2015).

1.3.1 SYKDOM HOS ROGNKJEKS

Hovedsakelig har bakterielle infeksjoner dominert sykdomsbildet hos rognkjeks, men virus og parasitter er også påvist. Bakteriesykdommene som har gitt størst utfordringer er atypisk furunkulose (*A. salmonicida*), vibriose (*V. anguillarum* O1) og Pasteurellose (*Pasteurella* sp.) (Karlsbakk et al., 2014, Bornø & Gulla, 2017). I 2016 var pasteurellose den mest rapporterte sykdommen etterfulgt av atypisk furunkulose (Bornø & Gulla, 2017). *Pseudomonas anguilliseptica*, *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* sp. er isolert fra rognkjeks (Johansen et al., 2016, Bornø & Gulla, 2017).

Atypisk furunkulose (*A. salmonicida*) har lenge vært antatt å den viktigste kjente dødelighetsårsaken hos rognkjeks etter utsett i sjø (Nilsen et al., 2014). Sykdommen gir sårdannelse og ved systemisk infeksjon bakterieansamlinger (mikrokolonier) og granulom i blant annet nyre, lever og milt (Nilsen et al., 2014, Bornø et al., 2016). Atypisk furunkulose opptrer både i settefiskanlegg og etter utsett i sjø. Basert på typeinndeling av bakterien (se kap 1.4) er det vist at A-lagstype I, II, III, V og VI opptrer hos rognkjeks. Type V og VI er vanligste å finne hos rognkjeks i Norge (Bornø et al., 2016, Gulla et al., 2016). Type I identifisert i rognkjeks er en antatt lokalstamme, og var påvist i Trøndelag ved tre lokaliteter i 2016 (Bornø & Gulla, 2017). Type II har opptrådt hos rognkjeks i Norge, og type III hos rognkjeks på Færøyene ved ett tilfelle (Øyvind Vågnes, pers.kom.). Rognkjeks satt ut i anlegg med villfanget leppefisk vil være ekstra utsatt for smitteoverføring, ettersom en dokumentert lav prosentandel av villfanget leppefisk er bærer av bakterien *A. salmonicida*, som kan gi høy prevalens etter utsett i merd (Gulla et al., 2015).

Pasteurella sp. er påvist langs hele kysten hos rognkjeks under yngelproduksjon og etter sjøsetting (Nilsen et al., 2014, Alarcón et al., 2016, Bornø & Gulla, 2017). Ved systemisk infeksjon gir bakterien småsår på hode og ved øynene, finneråte, blødninger i gjeller, flekker og sår i huden, granulomer, svullen milt, og væskeansamling i mage og tarm (Nilsen et al., 2014, Alarcón et al., 2016). *Pasteurella* sp. er isolert fra rognkjeks i Norge, Skottland og Færøyene (Duncan Colquhoun, pers. kom.). Bakterien er beslektet til *Pasteurella skyensis* (atlantisk laks, Skottland) og *Pasteurella* sp. hos atlantisk laks i Norge, som har forårsaket

den systemiske sykdommen Varracalbmi ("blodøye") ved flere tilfeller i Nord-Norge (90-tallet), Hordaland (1999) og Sogn og Fjordane (2012) (Valheim et al., 2000, Birkbeck et al., 2002, Alarcón et al., 2016). Det er ingen indikasjon på at *Pasteurella* sp. isolert fra rognkjeks er en trussel for atlantisk laks i Norge, eller at *Pasteurella* sp. isolert fra atlantisk laks i Norge utgjør en smitterisiko for rognkjeks (Johansen et al., 2016). *Pasteurella* kolonier på skål og histologiske mikrokolonier ligner på *A. salmonicida*, og er regnet som en differensialdiagnose til atypisk furunkulose (Poppe et al., 2013).

Klassisk vibriose (*V. anguillarum*) har vært et betydelig helseproblem i settefiskfasen hos rognkjeks, med akutt dødelighet, finneråte og appetittsvikt (Nilsen et al., 2014). Serotype O1 og O2a er isolert fra rognkjeks, men O1 er hyppigst påvist (Johansen et al., 2016). *V. ordalii* er vist å være patogen for rognkjeks, men andre *Vibrio*-bakterier er isolert fra syk rognkjeks (feks *V. splendidus*, *V. fisheri*, *V. logei*, *V. wodanis*), og er ikke antatt å være primære sykdomsfremkallere, men heller opportuniste i syk og stresset fisk (Nilsen et al., 2014, Bornø & Gulla, 2017).

P. anguilliseptica ble først påvist hos rognkjeks i Norge i 2011, og er også påvist på Færøyene (Johansen et al., 2016). Bakterien kan gi sykdom med foreløpig lav dødelighet, og antallet rapporteringer har vært økende de siste årene (Johansen et al., 2016, Bornø & Gulla, 2017).

Det er nylig publisert en artikkel fra Irland som viser at rognkjeks kan bli infisert med bakterien *Piscirickettsia salmonis*. Kliniske tegn var utpreget ascites, multifokal levernekrose, diffus betennelse og nekrose i eksokrin pankreas og omkringliggende pankreatisk fettvev (Marcos-López et al., 2017). *P. salmonis* er funnet hos atlantisk laks i Norge, uten høy dødelighet (Olsen et al., 1997). Bakterien er foreløpig ikke identifisert fra rognkjeks i Norge.

Få virus er kjent å infisere rognkjeks, men VHSV (viral hemorrhagic syndrome virus) er påvist hos rognkjeks på Island (Bornø & Gulla, 2016, EURL, 2016, s.25). Under kontrollerte smitteforsøk er rognkjeks vist å kunne være reservoar for IPNV (Infectious pancreas necrosis virus) (Nofima, 2015). I 2016 ble viruset nå kjent som Lumpfish Flavivirus (LFV) antatt å forårsake dødelighet hos rognkjeks i settefiskanlegg og etter utsett i sjø (Mari Solheim, pers.kom.). Kun en aktør diagnostiserer viruset.

Rognkjeks kan være vert for minst 59 kjente parasittarter, men få av disse er antatt å være en

sykdomstrussel (Karlsbakk et al., 2014). Amøben *Paramoeba perurans* forårsaker gjellesykdommen AGD (Amoebic gill disease) hos atlantisk laks (Steinum et al., 2008). Rognkjeks kan også bli infisert, men virker mer resistent og kan trolig fungere som en asymptomatisk bærer av amøben (Haugland et al., 2016). Parasitten *Nucleospora cyclopteri* kan gi svulne nyrer (grunnet uhemmet deling av leukocytceller), eksoftalmi og anemi (Karlsbakk et al., 2014). Mikrosporidien har fått oppmerksomhet grunnet den immunsupprimerende parasitten *N. salmonis* hos laks, og antagelse om lignende effekt av *N. cyclopteri* hos rognkjeks (Wongtavatchai et al., 1995, Henriette Glosvik, pers.kom.). *Gyrodactylus* sp. kan opptre på hud og gjeller hos rognkjeks, og kan potensielt bli et problem i oppdrett (Bornø & Gulla, 2016). Påslag med skottelus (*Caligus elongatus*) er blitt rapportert hos rognkjeks, spesielt fra Nord-Norge, men betydning av lusen er ukjent (Bornø & Gulla, 2017, Nodland, 2017).

Patogener som infiserer både rognkjeks og atlantisk laks inkluderer bakteriene *A. salmonicida* (type I og VI), *V. anguillarum* O1 og O2a, *M. viscosa*, *Tenacibaculum* sp. og *Pasteurella* sp. (ulike typer hos rognkjeks og laks), og amøben *P. perurans* (Johansen et al., 2016). Med unntak av *V. anguillarum* O1 og O2a og amøben *P. perurans* er ingen av de andre patogenene regnet å være en sterk trussel for smitteoverføring mellom rognkjeks og laks (Haugland et al., 2016, Johansen et al., 2016). For *V. anguillarum* og *A. salmonicida* er det antatt at vaksinerings av laks vil beskytte mot smitteoverføring mellom artene (Johansen et al., 2016).

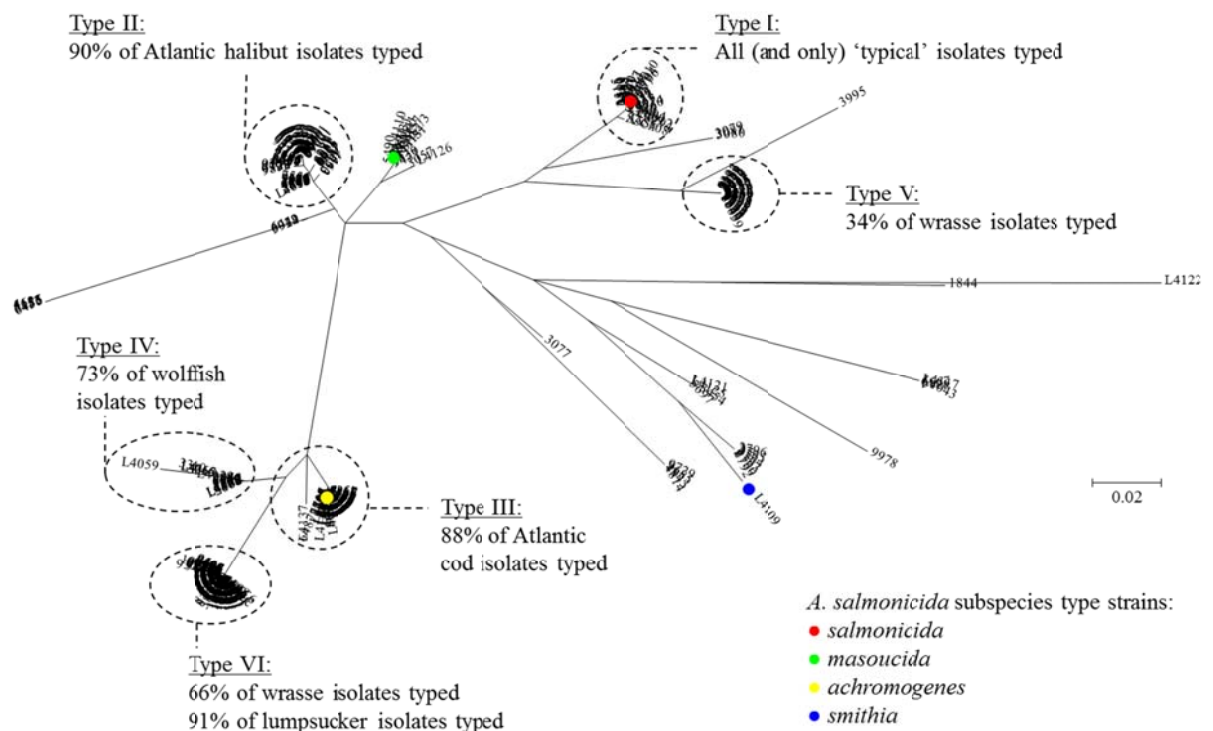
1.4 AEROMONAS SALMONICIDA

Aeromonas salmonicida er et av de eldst beskrevne og mest kjente fiskepatogene, og tilhører genus *Aeromonas*, med 14 tilhørende arter (Abbott et al., 2003, Austin & Austin, 2007). Arten *A. salmonicida* har forårsaket store økonomiske tap hos kultivert fisk (spesielt salmonider) og er rapportert å gi sykdom hos 20 oppdrettede og 30 ville fiskearter (Wiklund & Dalsgaard, 1998, Austin & Austin, 2007). Klassisk furunkulose (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) ble først kjent i Tyskland under navnet «ørretsykdommen», og forårsaket massiv dødelighet i oppdrettslaks i Norge på slutten av 80- og begynnelsen av 90-tallet (Poppe & Bergh, 1999, Sommerset et al., 2005, Austin & Austin, 2007).

A. salmonicida er gram-negative, fakultativt anaerobe, og ubevegelige stavbakterier, som

fermenterer glukose og er resistente mot vibriostaticum 0/129 (Poppe & Bergh, 1999, Beaz-Hidalgo & Figueras, 2013). Bakteriene er oksydase- og katalase positiv, vokser ikke ved 37°C, og utsatt for overvekst av opportunistiske bakterier (Austin & Austin, 2007). Koloniene er sirkulære, konvekse, og upigmenterte kolonier er gråhvite (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). Det finnes variasjoner innenfor arten, blant annet i produksjon av det vannløselige, brune pigmentet synlig hos subsp. *salmonicida* (Austin & Austin, 2007).

Det har tidligere vært vanlig å omtale bakterier av *A. salmonicida* som typisk eller atypisk, med underartene (subsp.) *salmonicida* (typisk), *achromogenes*, *masoucida*, *pectinolytica* og *smithia* (Evelyn, 1971, Austin & Austin, 2007). Nyere forskning viser en alternativ inndeling basert på en hypervariabel region i *vapA*-genet, tilhørende bakteriens A-lag (Additional layer protein) (Gulla et al., 2016). Det ble vist på bakgrunn av sekvensvariasjoner i *vapA* at isolat av *A. salmonicida* kunne deles i 14 typer (figur 1.3) (Gulla et al., 2016). Studiet indikerte at A-lagstyper kan være knyttet til fiskeart eller -familie. Upublisert materiale viser nå at i alle fall 21 A-lagstyper eksisterer (Duncan Colquhoun, pers.kom.). Diagnostisk arbeid hos rensefisk viser at A-lagstype V og VI er de hyppigst tilstedeværende (Gulla, 2015, Bornø et al., 2016).

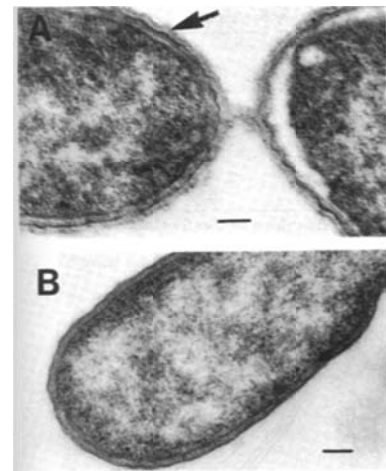


Figur 1.3 Oversikt over A-lagsinndeling av *A. salmonicida*, med subarter og undersøkte fiskearter i størst assosiasjon til de ulike A-lagstypene. 91% av isolatene for rognkjeks var type VI (Gulla, 2015).

1.4.1 A-LAG OG VIRULENS

A-laget er et beskyttende hydrofobt proteinlag festet til LPS (lipopolysakkarid) på bakteriens overflate, og viktig for bakteriens virulens (Belland, 1985, Daher et al., 2011). Det hypervariable området utgjør en begrenset del av *vapA*-genet, som er antatt å kode for en overflatekspontert og immunogen del av A-laget, og er blant annet vist å beskytte mot serumkomplement aktivert ødeleggelse (Gulla et al., 2016, Munn et al., 1982).

Dersom bakterien blir utsatt for økt temperatur, kan stammer av *A. salmonicida* miste uttrykkningen av A-laget, gjennom innsetting (insertion) eller tap (deletion) av nukleotider (Belland, 1987, Gustafson et al., 1994). Virulente *A. salmonicida* bakterier dyrket ved 30°C, ga 90 % attenuerte celler med tapt A-lag (figur 1.4) (Ishiguro et al., 1981). A-lagsproteinene er essensielt for immunologisk beskyttelse ved vaksiner, og stammer som er A-lagsnegative (A^-) har nedsatt virulens og evne til å indusere en beskyttende immunrespons dersom de nyttes som antigen i en vaksine (Lund et al., 2003). A-lagspositive (A^+) bakterier er auto-aggregerende under vekst, mens A^- bakterier ikke aggregerer, en egenskap knyttet til A-lagsproteinets hydrofobe karakter (Ishiguro et al., 1981, Johnson et al., 1985). På CBB (Commassie Brilliant Blue Agar) blir A^+ bakterier mørk blå, mens A^- får hvite eller svakt blå kolonier (Cipriano & Bertolini, 1988).



Figur 1.4 *A. salmonicida* med A-lag (A) og uten A-lag (B) (Ishiguro et al., 1981).

Bakterien har også andre komponenter som fremmer virulens, blant annet et stort plasmid (pAsa5 eller pASvirA), som er kjent for å kode for proteiner viktig for type III sekresjonssystem (T3SS) og toksinsekresjon (Reith et al., 2008, Daher et al., 2011). Det er vist at dyrking selv ved 25°C kan forårsake en rearrangering av plasmid pAsa5, som fører til attenuert virulens hos bakterien (Daher et al., 2011).

1.5 IMMUNSYSTEMET HOS TELEOSTER

Lite er kjent for rognkjeksens immunsystem, og generell immunologi hos teleoster vil derfor bli presentert i dette avsnittet, i tillegg til et avsnitt om det som er publisert for rognkjeks.

Immunsystemet er kroppens beskyttelse mot infeksjoner og fremmede stoffer, og består av en medfødt (uspesifikk), og en adaptiv (spesifikk) del (Borgen & Munthe, 2007). Det medfødte immunsystemet er et førstelinjeforsvar, og kroppens naturlige resistens mot patogener (Poppe & Bergh, 1999, Magnadóttir, 2006). Fysiske barrierer, som intakt hud og slimlag, beskytter fiskens utsatte områder (gjeller, hud og tarm) for patogeninvadering (Magnadóttir, 2006, Borgen & Munthe, 2007, Ángeles Esteban, 2012).

Fiskens uspesifikke immunitet baserer seg på celler med ulike funksjoner (cellulær del), og ulike stoffer i serum og vevsvæsker (humoral del) som destruerer inntrengende fremmedsubstanser (Gudding, 2010). Vevsvæsker og serum inneholder for eksempel komplement, cytokiner, lysozym, C-reaktivt protein og andre antimikrobielle stoffer (Gudding, 2010, Jørgensen, 2014). Fisken skiller egne celler og inntrengende substanser ved å bruke reseptorene PRR (pattern recognition receptors) som gjenkjenner PAMP'er (Pathogen associated molecular patterns). PAMP'er er strukturer fraværende i flercellede organismer, for eksempel peptidoglykaner og lipopolysakkarider (LPS) i bakterieveggen eller dobbelttrådet ribonucleinsyre (RNA) fra virus (Magnadóttir, 2006, Murphy, 2012).

Immunsystemets spesialiserte celler kalles leukocytter (hvite blodceller), og deles inn i granulocytter (eosinofile, nøytrofile og basofile celler), monocytter/makrofager, dendrittske celler, NCC-celler (non-specific cytotoxic cells) og lymfocytter (T- og B-celler) (Poppe & Bergh, 1999, Murphy, 2012). Makrofager, dendrittske celler og B-celler fagocytterer og fremviser antigen for T-cellene ved hjelp av reseptorer kalt MHC II (major histocompatibility complex), som deretter aktiverer B-cellene til antistoffproduksjon (Jørgensen, 2014, Mutoloki et al., 2014).

Lymfocytter (T- og B-celler) tilhører det spesifikke immunsystemet og produseres i primære lymfoide vev (thymus og hodenyre), men kan fungere også i sekundære lymfoide vev (milt, gjeller, tarm og nyre) (Secombes & Wang, 2012). B-cellene står for antistoffproduksjon (immunoglobulin (Ig)), og fisk har antistoffene IgM, IgT og IgD (Zhang et al., 2010). IgM er det dominerende antistoffet ved systemisk infeksjon. Immunoglobuliner (Ig) fungerer som B-cellens reseptorer (BCR), og en antistoffproduksjon aktiveres ved stimulering av BCR'er. Denne aktiveringen kan oppstå enten ved T-celle uavhengige (TI) antigen eller ved T-celle avhengige (TD) antigen. TI-antigen kan direkte aktiverer B-lymfocytene uten hjelpeceller eller hjelpetfaktorer, i motsetning til TD-antigen som bruker antigen-presenterende celler, T-

lymfocytter, og ulike interleukiner for å aktivere B-cellene (Möller, 2001). TI-antigen er gjerne gram-negative bakterier med LPS (lipopolysakkarider) (Möller, 2001).

Det er funnet spesialiserte T- og B-celler i mucosa-associated lymfoid tissues (MALT) i fisk, bestående av GALT (gut associated lymfoid tissue), SALT (skin associated), GIALT (gill associated) og NALT (nasopharynx associated) (Salinas, 2015). Mukosa-vaksiner er av stor forskningsinteresse ettersom infeksjoner i mukosa-vev er vanlig hos teleost fisk, og en mulig stimulering av MALT kan gi et bedre forsvar mot infeksjoner og åpne for en langt lettere administrering av vaksiner (Saline, 2015).

1.5.1 IMMUNSYSTEMET HOS ROGNKJEKS

Rognkjeks er påvist å ha egenskaper som indikerer et velfungerende medfødt (uspesifikt) immunsystem, blant annet respiratory burst (frigjøring av reaktive oksygenradikaler fra immunceller) og fagocytterende leukocytter (Haugland et al., 2012). Rognkjeks har fagocytterende B-celler, og IgM er vist å være en tetramer (Rønneseth et al., 2015). Det er funnet IgM⁺ celler i perifert blod, i milt og hodenyre. Foreløpig er lite kjent rundt MALT hos rognkjeks, men analyser av SALT identifiserer proteiner knyttet til immun- og stressrespons (Patel & Brinchmann, 2017). Det er også påvist at rognkjeks har MHC II (Gyri T. Haugland, pers.kom.). Høy prevalens av bakterielle infeksjoner hos rognkjeks viser behovet for profylaktiske tiltak. Kunnskap om immunsystemet og vaksineforsøk hos rognkjeks indikerer at beskyttelse mot atypisk furunkulose, og sannsynligvis ytterligere bakterielle agens, forventes å være mulig (Rønneseth et al., 2017).

1.6 VAKSINERING AV FISK

Etter store bakterieforårsakende tap i norsk oppdrettsnæring på 1980-tallet, er vaksinasjon i dag det viktigste enkeltstående forebyggende tiltaket mot bakterieinfeksjoner (Sommerset et al., 2005, Gudding, 2010). I norsk oppdrettsnæringen er det i dag lovpålagt å vaksinere atlantisk laks (*Salmo salar*) mot klassisk vibriose, kaldtvannsvibriose og furunkulose (Akvakulturdriftsforskriften, 2008, §63). På tross av at det i dag ikke er krav om vaksiner av rensefisk, er det likevel antatt at bortimot all rognkjeks vaksineres før utsett i merd (Vestvik, 2017).

Målet med vaksiner er å indusere en langvarig spesifikk beskyttelse mot ett eller flere bestemte patogener (Sommerset et al., 2005, Berg et al., 2006). Beskyttelse oppnås ved at fisken utvikler immunologisk hukommelse mot antigen, som immuncellene senere gjenkjenner og kan bekjempe (Berg et al., 2006, Gudding, 2010). For at en vaksine skal ha god effekt, må fisken være frisk og ha et immunsystem som kan respondere på vaksinen. Immunsystemet utvikles etter størrelse på fisken, og organ, celler og responsveier må være tilstrekkelig utviklet for oppnåelse av en spesifikk og varig respons (Johansen et al., 2016). Fremstilling av vaksiner er arbeidskrevende, og forutsetter kartlegging av fiskeartens aktuelle patogener og valg av antigen som stimulerer til beskyttelse (Johansen et al., 2016).

1.6.1 VAKSINEFORMULERING OG ADMINISTRERING

Vaksiner fremstilles som inaktiverte, attenuerte, rekombinante eller DNA-vaksiner, og kan administreres som immersjon (bad og dypp), stikkinjeksjon eller oralt i fôret (Sommerset et al., 2005, Berg et al., 2006). Inaktiverte vaksiner baserer seg på drepte patogener (feks ved formalin) (Berg et al., 2006). Attenuerte vaksiner er svekkete levende patogener uten mulighet for å forårsake sykdom (Berg et al., 2006). Rekombinante vaksiner uttrykker antigener klonet i en vektor, og i Norge er en rekombinant vaksine fremstilt for IPNV (Infectious pancreas necrosis virus) (Sommerset et al., 2005). DNA-vaksiner inkorporer gen fra patogenet i vertens DNA for produksjon av protein og immunstimulering (Berg et al., 2006, Shoemaker & Klesius, 2014). DNA-vaksiner er antatt å ha god effekt, men er ikke tillatt i Norge (Berg et al., 2006).

Intracellulære bakterier (feks *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* og *Renibacterium salmoninarum*), virus og parasitter er vanskelig å vaksinere mot, grunnet patogen-egenskaper, kostbar produksjon og behov for høye antigentiter (Sommerset et al., 2005, Berg et al., 2006, Gudding & Goodrich, 2014). Vaksiner mot noen virussykdommer (IPN, PD og ILA) er utviklet for laks, men det er ingen tilgjengelige vaksiner mot fiskeparasitter (Sommerset et al., 2005, Gudding, 2010, Johansen et al., 2016).

Bad- og dyppvaksiner kan anvendes på liten fisk, er en enkel og lite stressende administreringsmetode, gir god effekt for enkelte bakterier (spesielt *Vibrio* spp.), men gir lavere beskyttelse og mindre nøyaktig dosering (Berg et al., 2006). Intraperitoneal stikkvaksiner er arbeidskrevende, og fisken må oppnå en minimumsvekt, bør anesteseres, og påføres intra-abdominale bivirkninger (Gudmundsdottir & Björnsdottir, 2007). Fordelen er nøyaktig dosering, tilsetning av adjuvans, og god immunbeskyttelse. Adjuvans (feks ulike

oljer) er en tilleggskomponent som aktiverer det uspesifikke immunsystemet og gradvis frigir antigen (depoteffekt) (Tafalla et al., 2014).

Oralvaksinering har antigen integrert i føret, og er regnet for å være den mest gunstige vaksineringsmetoden, med en lett administrering. Metoden er derimot vanskelig gjennomførbar, ettersom antigenene må være løselige i tarmen, og samtidig beskyttet for nedbrytning gjennom mage og fremre del av tarm (Sommerset et al., 2005, Gudding, 2010).

1.6.2 VAKSINERING AV ROGNKJEKS

Det er flere vaksiner tilgjengelig til rognkjeks (tabell 1.1), men effekt av vaksinene er foreløpig lite dokumentert. Anbefalt stikkpunkt for vaksinerings av rognkjeks er mellom bakre kant av sugekoppen og foran gattet (figur 1.5), med 90° stikk inn i bukhulen (Pharmaq, 2016). Feilstikk eller mangelfull sulting kan medføre deponering av vaksine i muskel eller indre organ. Intramuskulær injeksjon har vært utprøvd i forsøk med rognkjeks (Lundberg, 2016).

Anbefalt vekt for stikkvaksinering er 8-10 gram, og bør gjennomføres minst 500 dg (døgngrader), og fire uker før utsett (Johansen et al., 2016). Immunitetsutvikling tar tid, og upublisert materiale viser at det tar 600 dg før rognkjeksens spesifikke antistoffrespons mot *A. salmonicida* flater ut (Toni Erkinharju, pers.kom). Det er ennå ukjent hvor raskt en tilstrekkelig immunrespons er utviklet hos rognkjeks. Sekundæreksposering med antigenet før immunitet er oppnådd, kan gi dødeligheter i likhet med uvaksinert fisk.



Figur 1.5 Anbefalt stikkpunkt (svart merke) for vaksinerings av rognkjeks (Vaxxinoa Norway AS).

For å uttrykke effekt av en vaksine er relativ prosentvis overlevelse (relative prosent survival = RPS) en mye brukt metode, og estimerer vaksinens effekt ved hjelp av dødelighetsforholdet mellom vaksinert fisk og en kontrollgruppe i formelen: $RPS = (1 - (\% \text{ dødelighet vaksinert fisk} / \% \text{ dødelighet hos uvaksinert fisk})) \times 100\%$ (Gudding, 2014). Denne metoden involverer etiske

aspekt, ettersom infeksjon, lidelse og dødelig utgang hos ubeskyttet fisk er forventet. Smitteforsøk kan gjennomføres som intraperitoneal smitte (i.p smitte) eller kohabitant smitte. Ved i.p smitte får fisken injisert en smittedose i buken, mens kohabitant smitte involverer i.p smitte av et fåtall av fisk i karet, som deretter smitter resterende fisk. Kohabitant smitte samsvarer mest med et naturlig sykdomsutbrudd.

Tabell 1.1 Oversikt over tilgjengelige vaksiner til rognkjeks. Informasjon hentet fra bedriftenes hjemmeside eller i kontakt med bedriftsansatte.

Vaksinetype	Bedrift	Produktnavn	Antigen i vaksinen
Dypp	Vaxxinova	Autogen vaksine mot atypisk <i>Aeromonas salmonicida</i> og <i>Vibrio anguillarum</i> O1	<i>A. salmonicida</i> (ett isolat) og <i>V. anguillarum</i> O1
Stikk	Vaxxinova	VAXX ON MARINE 3 vet	Atypisk <i>A. salmonicida</i> (to isolater) og <i>V. anguillarum</i> O1. Kan inneholde <i>M. viscosa</i>
Dypp	Pharmaq	Alpha Marine Vibrio	<i>V. anguillarum</i> O1, O2a og O2b
Stikk	Pharmaq	AMARINE micro 4-2	<i>V. anguillarum</i> O1, O2a og O2b og <i>A. salmonicida</i> (to isolat).

1.6.3 VAKSINEBIVIRKNINGER

Vaksinering er en forutsetning for akseptabel dyrevelferd i norsk oppdrett, men stikkvaksinering medfører også negative bivirkninger for fisken (Berg et al., 2006). Ettersom rognkjeks er en forholdsvis ny art i oppdrett, og vaksinering begynte i småskala i slutten av 2013, er bivirkninger hos arten lite kjent (Eivind Isdal, pers.kom.). Generelle bivirkninger observert hos stikkvaksinert fisk (hovedsakelig dokumentert hos atlantisk laks) omfatter sammenvoksninger i bukhulen (adheranse), melanindeponering, vekstreduksjon og ryggradsdeformiteter (Berg et al., 2006).

1.7 DYREVELFERD

Fisk er underlagt Dyrevelferdsloven i Norge, og i §3 påpekes det at: ”..Dyr skal behandles godt og beskyttes mot fare for unødige påkjenninger og belastninger” (Dyrevelferdsloven, 2009). Rensefisk er regnet som akvakulturdyr, og faller derfor under gjeldende lover og

regelverk. Det knyttes etiske aspekt til bruk av rensefisk i oppdrett, på grunn høy dødeligheten relatert til fangst, lagring, transport, bruk i laksemerder og påfyll av rensefisk etter høy utgang (Bornø & Lie Linaker, 2015).

1.8 MÅL MED STUDIET

Dette studiet var et FHF-prosjekt (nr 901264) delt inn i to arbeidspakker. Denne masteroppgaven omfattet arbeidspakke nummer to i prosjektet, med tittel: Feltoppfølgning av vaksinert rognkjeks mot *Aeromonas salmonicida* A-lagstype V og VI. Hovedmålet med studiet var å kartlegge prestasjon av rognkjeks vaksinert mot *A. salmonicida* type V og VI, og *V. anguillarum* O1, som en indikator på vaksinenes prestasjon i felt. Studiet baserte seg på feltoppfølgning av en vaksinert og en uvaksinert gruppe rognkjeks satt ut i et kommersielt lakseproduserende anlegg.

- Delmål 1: Indikere vaksinenes prestasjon ved sammenligning av dødelighet, vekst, og påvisning av *A. salmonicida* ved bakteriedyrking, sanntids RT-PCR (hodenyrevev og gjellevev) og histologi, hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks.
- Delmål 2: A-lagstype positive funn av *A. salmonicida* ved genotypisk A-lagstyping, og undersøke fenotypisk gruppering av A-lagstype V og VI gjennom biokjemiske tester i API 20 NE.
- Delmål 3: Indikere antall smittekilder i anlegget basert på en MLVA-analyse (Multilocus variable number tandem repeat analysis).
- Delmål 4: Beskrive andre dødelighetsårsaker som kan ha forårsaket eller medvirket til dødelighet og sykdom hos rognkjeks i studiet.
- Delmål 5: Registrere vaksinebivirkninger hos den vaksinerte rognkjeksgruppen, for å dokumentere vaksinenes tilstedeværelse og synlige effekt hos rognkjeks.

2 METODE OG MATERIALE

Feltoppfølging av rognkjeks varte fra august 2016 til januar 2017, og inkluderte fem prøveuttak, to før utsett i sjø, og tre etter utsett i sjø.

2.1 FISK INKLUDERT I STUDIET

Rognkjeks ble oppdrettet på et kommersielt settefiskanlegg i region vest. Lokal villfanget stamfisk ga opphav til rogn (17.-19.des.16), som klekket etter 286 dg (9,5-9,8°C). Rognkjeksene ble sortert to ganger, og etter 1650 dg (6,3-11,1 °C) ble én gruppe vaksinert (kap 2.1.1). De to rognkjeksgruppene ble holdt i separate kar frem til utsett (temp 8,8-14,0°C). Vaksinert (n=26 415) og uvaksinert (n=20 558) rognkjeks ble transportert i separate tankbiler til et kommersielt sjøanlegg i Sunnhordland (20. sep 2016). Transportlengden var ca 12 timer, og tankbilene ble fraktet ut til anlegget ved fergetransport.

2.1.1 VAKSINEN OG VAKSINERING

Det ble brukt to vaksiner i studiet, produsert av Vaxxinova Norway AS. Dyppvaksinen var vannbasert og inkluderte *A. salmonicida* type VI og *V. anguillarum* O1. Stikkvaksinen var trivalent og inneholdt *A. salmonicida* type V og VI, og *V. anguillarum* O1 emulgert en i vegetabilsk oljeadjuvans (tabell 2.1). Grunnet underbemanning ble kun deler av gruppen (n≈20 000) dyppvaksinert. Hele gruppen (n≈26 500) fikk injisert vaksine intraperitonealt ved 10 gram (vanntemp. 9,3°C). Rognkjeksene ble ikke bedøvd ved vaksinerings. Den uvaksinerte rognkjeksene forble ubehandlet og uhåndtert. Rognkjeksene ble satt ut 522 dg etter stikkvaksinerings.

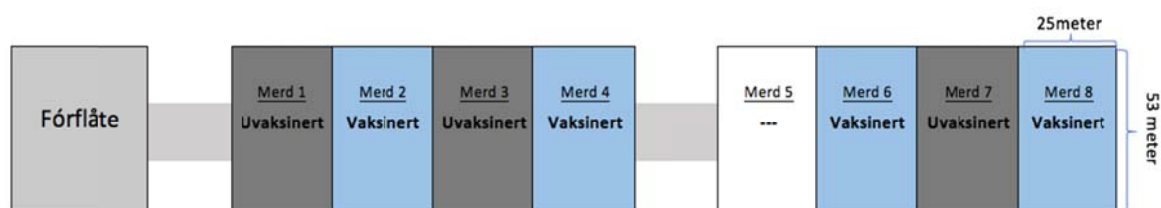
Tabell 2.1 Antigenisk innhold, dose og administrering av vaksiner brukt i studiet. I overkant av 26 500 rognkjeks ble stikkvaksinert (6.aug 2016), og av disse ble ca 20 000 dyppvaksinert i forkant (28. juli 2016) av stikkvaksinerings.

Vaksine	Antigenisk innhold	Dose	Administrert
Dyppvaksine	Formalin-inaktiverte <i>A. salmonicida</i> A-lagstype VI (16-00574-02) og <i>V. anguillarum</i> O1 (16-00574-01)	1:10 fortynning (1 l vaksine og 9 l sjøvann) 30 sek eksponeringstid.	Dypp
Stikkvaksine	Formalin-inaktiverte <i>A. salmonicida</i> A-lagstype V (15-00643-05) og VI (15-00643-03), og <i>V. anguillarum</i> O1 (14-01066-06)	0,05 ml/dose	Intra- peritonealt

2.2 ANLEGGET, DRIFTSRUTINER OG MILJØFORHOLD

Matfiskanlegget i Sunnhordland var et stålanlegg bestående av åtte merder (33 130 m³/merd). Sju av merdene inneholdt laks og villfanget leppefisk (tabell 2.2). Vaksinert rognkjeks ble satt ut i merd 2, 4, 6 og 8, og uvaksinert rognkjeks i merd 1, 3 og 7 (figur 2.1, tabell 2.2). Anlegget hadde ikke tidligere brukt rognkjeks, men i en årrekke hatt leppefisk. Den villfangete leppefisken i anlegget var fanget i fire fangstsoner i Hordaland og nord-Rogaland.

Hver merd var utstyrt med omtrentlig 200 meter rensefiskskjul. Skjulene var levert av OK Marine og NorseAqua og besto av gardintare og enkeltstrimler. Skjulene strakk seg fra overflaten og 8-10 meter ned i sjøen. For ikke å komme i konflikt med LiftUp (dødfiskopptak), var skjulene plassert i ene halvdel av merden. Skjulene ble tørket ved behov. Maskestørrelsen (stolpelengde/side x 2) på nøtene var 40mm. Spyling av nøter ble gjennomført hver 14. dag til slutten av november, og deretter månedlig.



Figur 2.1 Oversikt over stålanlegget, med fordeling av vaksinert og uvaksinert rognkjeks i de ulike merdene i anlegget.

Tabell 2.2 Beholdning av rognkjeks, villfanget leppefisk og laks i anlegget ved utsett av rognkjeks i anlegget.

Merd	Gruppe	Antall rognkjeks	Antall leppefisk	Innbland. rensefisk	Rensefisk/ meter skjul	Antall laks	Vekt laks (gram)
1	Uvaksinert	6526	4216	9,3 %	54	115 474	3 309,8
2	Vaksinert	6450	4266	9,4 %	54	114 230	3068,6
3	Uvaksinert	7454	5073	10,6 %	63	118 387	2893,0
4	Vaksinert	6564	5001	9,9 %	58	116 514	3153,8
6	Vaksinert	6658	3735	9,0 %	52	114 874	2807,1
7	Uvaksinert	6578	5059	10,0 %	58	115 835	2810,6
8	Vaksinert	6743	5591	10,5 %	62	118 062	2965,4

Rognkjeksene ble fôret med Amber Neptun fra Skretting, pelletstørrelse 1,5mm. En opptrekkbar fôringsautomat (Fiap klokkeautomat pro 3kg/12t) fôret over det største skjulet i hver merd. Rognkjeksene ble generelt fôret tre ganger per uke. Fôringsmengde ble ikke registrert, men estimert til 5-10kg fôr/merd/uke. Den første måneden var vandunker (med utkuttete åpninger) hengt i vannoverflaten for å supplere som fôrstasjoner, men ble fjernet grunnet lite effekt.

Daglig ble salinitet og temperatur målt på 0,5, 5 og 10 meters dybde, og oksygen på 5 meters dybde. Fiskehelsetilsyn og telling av lakselus på laksen i anlegget ble gjennomført i henhold til lovgivning.

2.3 DØDELIGHET

Dødelighet ble registrert daglig i anlegget, så langt forholdene tillot det. Dødfisk ble tatt opp ved hjelp av Lift Up (lufttrykk). Dødfisktall ble notert i bedriftens interne digitale registreringssystem. For å kompensere for udokumentert dødelighet (svinn) ble et tillegg på 20% lagt til månedlig. Dødelighetsresultat i denne oppgaven ble gjort på bakgrunn av dokumentert dødelighet, og inkluderte ikke månedlig tillegg på 20%. Dødelighet ble fremstilt som akkumulert dødelighet (%) for de to rognkjeksgruppene, i tillegg til akkumulert dødelighet av rognkjeks på merdnivå.

2.4 PRØVEUTTAK

Prøvematerialet ble innhentet gjennom fem uttak i studiet (tabell 2.3). Prøveuttak 1 ble gjennomført og analysert av fiskehelsebiolog og veileder Øyvind Brune Vågnes (Vaxxinova Norway). Ved hvert uttak var det planlagt å vektregistrere 50 rognkjeks/gruppe, ta bakterieutstryk og vevsprøver fra 20 rognkjeks/gruppe og 5 rognkjeks/gruppe til histologi. Registrering av vaksinebivirkninger var tiltenkt for alle vaksinerte rognkjeks prøvetatt i studiet. I sjø var det tiltenkt å ta prøver fra leppefisk i likhet med rognkjeks.

På settefiskanlegget ble rognkjeks fra et vaksinert og et uvaksinert kar håvet tilfeldig, og prøvetatt. I sjø ble rognkjeks fra samtlige merder prøvetatt ved alle tre uttakene. Antallet rognkjeks fra hver merd varierte. Både friske individ og svimere ble prøvetatt. Døde individ

ble ikke inkludert, på grunn av ujevn tilgang på dødfisk, og mulig forurensing med miljøbakterier.

Leppefisk ble fanget i teiner, og ved prøveuttak 3 og 4 ble leppefisk fra merd 1 og 6 prøvetatt. For prøveuttak 5 ble leppefisk fra samtlige merder prøvetatt, med uttak av merd 1.

Innfanget rognkjeks og leppefisk ble bedøvet med Finquel MS-222 (Tricaine Methanesulfonate), og avlivet ved transversalsnitt gjennom den forlengede marg (rognkjeks) eller bløgging av gjellebue (leppefisk).

All prøvetatt fisk ble undersøkt for utvendige og innvendige makroskopiske kliniske tegn. Sykdomsrelaterte eller avvikende observasjoner ble notert, og fungerte som supplerende informasjon ved analysering av prøvemateriale.

Tabell 2.3 Oversikt over prøveuttak i studiet. Vaksinert rognkjeks (V), uvaksinert rognkjeks (UV) og leppefisk (L). Alle individene var levende før prøvetaking. Før utsett i sjø: prøveuttak 1 og 2. Etter utsett i sjø: Prøveuttak 3, 4 og 5. Prøveuttak 6: tiltenkt, men ikke gjennomført prøveuttak.

Dato	Gr.	Vekt	Utstryk (BA)	Utstryk (BAS)	Vevsprøve hodenyre	Vevsprøve gjelle	Vaksinebivirkn.	Histologi
		Antall	Antall	Antall	Antall	Antall	Antall	Antall (analysert)
Prøveuttak 1 10.08.16	V	74	20	20	20	----	----	----
	UV	72	20	20	20	----	----	----
Prøveuttak 2 19.09.16	V	50	20	20	20	----	----	6 (3)
	UV	50	20	20	20	----	----	6 (3)
Utsett av rognkjeks i sjø								
Prøveuttak 3 17.-19.10.16	V	52	20	20	20	19	11	5 (5)
	UV	56	20	20	20	20	----	5 (5)
	L	*	20	20	20	20	----	5 (2)
Prøveuttak 4 7.-9.11.16	V	37	20	20	20	20	19	5 (3)
	UV	43	20	20	20	20	----	5 (3)
	L	*	20	20	20	20	----	5 (2)
Prøveuttak 5 6.-8.12.16	V	41	20	20	20	20	20	5 (3)
	UV	22	20	20	20	20	----	5 (3)
	L	*	15	15	15	15	----	4 (2)
Prøveuttak 6 16.-18.01.17	V	---	----	----	----	----	----	----
	UV	----	----	----	----	----	----	----
	L	----	----	----	----	----	----	----
Totalt	V	254	100	100	100	99	40	21 (14)
	UV	243	100	100	100	100	----	21 (14)
	L	*	55	55	55	55	----	15 (6)

* Vektregistrering ble ikke gjennomført for leppefisk i anlegget. --- = ikke gjennomført.

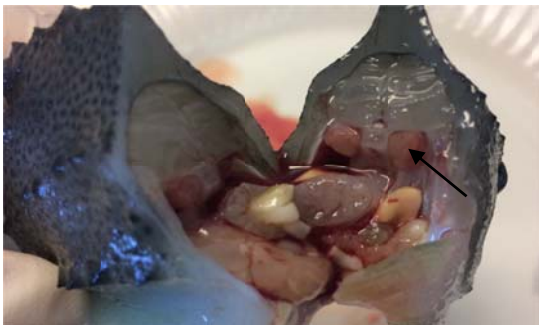
2.4.1 VEKT

Tilsynelatende friske individ ble favorisert, og bedøvelse ble ikke brukt ved vektregistrering. På settefiskanlegget ble tilfeldige rognkjeks håvet fra hver av de to gruppene, og veiet med +/- 1,0 grams nøyaktighet. På sjøanlegget ble fisken håvet inn ved å dra opp skjulene, og veiet med +/- 2,0 grams nøyaktighet. Gjennomsnittsvekt og SGR (specific growth rate) % ble brukt for å beskrive rognkjeksens vekst i studiet.

$$\text{SGR \%} = ((\text{sluttvekt}/\text{startvekt})^{(1/\text{dager})-1}) \times 100$$

2.4.2 BAKTERIEUTSTRYK

Utstryk fra hodenyre (figur 2.2) ble sådd ut på blodagarskåler (BA: blodagar med 5 % okseblod og 0,5 % NaCl) og blodagar med salt (BAS: blodagar med 5 % okseblod og 2 % NaCl). Det ble sådd ut to fisker per skål. Skålene ble tydelig merket, og oppbevart i kjøleskap før og under uttak (2-3 dager), og deretter inkubert ved 15 °C (BAS) eller 20°C (BA) i en uke. Alle agarskåler i studiet ble kjøpt fra Veterinærinstituttet i Oslo.



Figur 2.2 Bakterieuutstryk og uttak av hodenyrevev (PCR) ble tatt ut etter et transversalsnitt.

2.4.3 UTTAK AV PCR-PRØVER

En A- og B-vevsprøve (str. fyrstikkhode) fra hodenyre og gjeller ble overført til separate rør med 600µl RNAlater, for å hindre degradering av RNA. RNAlater-rørene ble oppbevart i romtemperatur frem til vevsuttaget, og deretter i kjøleskap opptil en uke før de ble fryst ved -18°C. Det ble ikke tatt ut gjelleprøver før utsett i sjø (prøveuttak 1 og 2).

2.4.4 UTTAK TIL HISTOLOGI

Svimere eller individ med særtrekk som sår, bleke organ eller unormalheter ble favorisert. Uttak til histologi inkluderte gjeller, hjerte, nyre, milt, pylorus og lever. Muskel var inkludert ved prøveuttak 4 og 5. Det ble ikke tatt ut histologi fra prøveuttak 1, grunnet sen beslutning om inkludering av histologi i studiet. Struktur antatt å være gonade ble tatt ut hos noen individ. Organbiter ble lagt i 4% fosfat-bufret formalin i forholdet 1:10.

2.4.5 VAKSINEBIVIRKNINGER

Vaksinert rognkjeks ble registrert for vaksinebivirkninger ved prøveuttak 3, 4 og 5 (tabell 2.3). Registreringen ble gjort etterfølgende av bakterieutstryk og vevs-uttak fra hodenyre og gjellevev. Adheranse (grad 0-6), melanin (grad 0-3) og vaksinerester (grad 0-3) ble registrert ved hjelp av en modifisert Speilbergs skala (Eivind Isdal, Vaxxinova Norway AS, appendiks 1) og notert i registreringsskjema (tabell 2.4). En hovedscore for adheranse ble gitt hvert individ og på bakgrunn av høyeste regionsverdi.

Tabell 2.4 Registreringsskjema for vaksinebivirkninger brukt i studiet.

Fisk nr	Adheranse (grad 0-6)			Melanin (grad 0-3)		Vaksinerester (grad 0-3)
	Region 1	Region 2	Region 3	Organ	Bukhinne/ muskel	

2.5 ANALYSERING AV PRØVEMATERIALE

Bakteriologisk og molekylærbiologisk arbeid ble gjennomført ved laboratoriet til Vaxxinova Norway (Kong Christian Frederiks plass 3, Bergen). Histologiprøver ble snittet av Veterinærinstituttet i Bergen (Bontelabo 8, Bergen), og mikroskopert med et Zeiss AXIO Scope.A1 (med kamera) tilhørende Sea Lice Research Center (Thormøhlensgate 55, Bergen).

2.5.1 FENOTYPISK KARAKTERISERING AV SEKUNDÆRKULTURER

Primærskåler fra hodenyreutstryk på BA og BAS fra 255 individ i studiet ble inkubert i en uke før skåler uten vekst eller med lavt antall kolonier uforenelig med *A. salmonicida* ble kastet. *A. salmonicida* lignende bakterier og andre bakterier av betydelig antall ble sådd videre sekundært. Morfologiske tegn som størrelse, koloniform og -farge, pigmentering, hemolyse og skyvbarhet ble registrert.

Basert på morfologi ble bakterier i renkultur testet for oksydase (Merck KGaA, Damstadt, Tyskland) og følsomhet for 0/129 150µg Vibriostaticum (Rosco Diagnostica, Taastrup, Danmark). Vibriostatsensitive isolat ble testet for ALO: arginine dihydrolase, og lysine- og ornithine decarboxylase (Veterinærinstituttet, Oslo, Norge) og 5-rør sukkerforgjæring: arabinose, cellulose, laktose, mannose, sakkarose og trehalose (Veterinærinstituttet, Oslo, Norge) over sju dagers inkubering ved 15/20°C.

Antatte *V. anguillarum* O1 bakterier ble undersøkt med agglutinasjonstest for *V. anguillarum* O1/O2 (Bionor Laboratories AS, Skien, Norge), morfologiske trekk, ALO og sukkerforgjæring.

2.5.1.1 Fenotypisk typing

Basert på kolonimorfologiske egenskaper ble *A. salmonicida* isolat fra 23 fisker testet med API® 20 NE (bioMérieux, Marcy-I'Etoile, Frankrike). Hensikten var å se etter biokjemiske forskjeller mellom *A. salmonicida* type V og VI. To isolat fra A-lagstype V og VI ble testet ved bruk av API 20 E (bioMérieux, Marcy-I'Etoile, Frankrike). Testenes vedlagte prosedyrer ble fulgt. Avvikende fra produsentens prosedyre var inkubering i 5 døgn (15°C/20°C), istedenfor 24 timer ved 36°C (API® 20 E) og 48 timer ved 29°C (API® 20 NE), og >4 kolonier i startløsningen.

2.5.2 SANNTIDS RT-PCR

I studiet ble det brukt en ett-steps sanntids RT-PCR for diagnostisering av *A. salmonicida*. Sanntids RT-PCR (sanntids revers transkriptase polymerasekjedereaksjon) bruker enzymet revers transkriptase til å omdanne RNA til et enkelt-trådig DNA (cDNA) amplifisert og detektert ved hjelp av spesifikke primere og prober. TagMan prober ble benyttet i påvisningen av *A. salmonicida*, og er spesifikke for et segment lokalisert mellom de to primerne brukt i

reaksjonen. TaqMan probene har et fluorescerende reportertermolekyl knyttet til 5'enden og en elektronegativ MGB quencher i 3'enden, som trekker til seg elektron fra reporteren og hindrer fluorescens. Ved hver vellykket amplifisering, vil en Taq-polymerase treffe proben, reporteren frigjøres og avgi et lyssignal (Wilson & Walker, 2005, s.215).

Prosedyre: Øyemålsprøver på 2 x 2 x 3 mm fra gjellevev (n=254) og hodenyrevev (n=255) oppbevart i RNAlater ble overført til mikrorør tilsatt 750 µl Qiazol og en stålkule (5mm). Prøvene ble homogenisert i 2 x 5min ved 25 Hz (TissueLyser II system) og oppbevart ved -18 °C inntil rensing. Personale på Vaxxinova Norway gjennomførte resten av prosedyren. RNA ble ekstrahert og rensset ved hjelp av RNeasy 90 Universal Tissue kit på BioRobot Universal System rensrobot (Qiagen). Renset materiale ble lagret på - ≥70°C.

PCR reaksjonene ble satt opp ved hjelp av en pipetteringsrobot (QIAgility). Rør med 15 µl mastermiks (appendiks 2) inneholdende primere for *A. salmonicida* og LumpElf 1a (tabell 2.5) og 5 µl rensset materiale ble kjørt i en sanntids RT PCR (Rotor-gene Q) med tilhørende program (tabell 2.6). PCR fra prøveuttak 5 var en duplex reaksjon (*A. salmonicida* + LumpElf 1a), mens primere for *A. salmonicida* og LumpElf 1a ble kjørt i separate PCR rør for uttak 1-4. Elongeringsfaktor (husholdningsgen) for rognkjeks (LumpElf 1a) ble brukt for å kartlegge tilstedeværelsen av rognkjeksvev i prøvene. Det ble ikke brukt elongeringsfaktor for leppefisken i studiet. Primerne benyttet for å påvise *A. salmonicida* var spesifikk for en konservert del av bakteriens *vapA*. Et kjent positivt *A. salmonicida* isolat ble brukt som kontroll ved PCR-kjøringene. Cut off verdi ble satt til Ct ≥37 (Vaxxinova prosedyre).

Tabell 2.5 Primersekvens (forward og reverse), probe og reporter-quencher benyttet i sanntids RT-PCR for påvisning av *Aeromonas salmonicida* og elongeringsfaktor for rognkjeks.

		<i>A. salmonicida</i>	LumpElf 1a (elongeringsfaktor for rognkjeks)
Primer	Forward 5'-3'	CGTTGGTGCTTCTATCACTGCTA	AGCTCGTCCCACCGACAA
	Reverse 5'-3'	AACAGCTACTTCACCCTGATTGG	GACTGTTCCGATACCTCCGATT
Probe	5'-3'	CCGTCAGGCTCGC	CCTGCAGGATGTCTAC
Reporter-Quencher		FAM-MGB	VIC-MGB

Tabell 2.6 PCR program på Rotor-Gene Q brukt til påvisning av *A. salmonicida* og elongeringsfaktor.

Prosess	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Steg 1	50 °C	30 min	1
Steg 2	95 °C	15 min	1
Steg 3	95 °C	15 sek	40
	60 °C	60 sek	

2.5.2.1

Genotypisk A-lagstyping

Hodenyrevev og gjellevev positivt for *A. salmonicida* ved sanntids RT-PCR, ble A-lagstypet etter samme PCR-metode som beskrevet i 2.5.2. Spesifikke primere for A-lagstype V og VI, basert på den hypervariable delen av *vapA* ble benyttet (Øyvind Vågnes, Vaxxinova Norway).

Bakterieisolat morfologisk antatt å være *A. salmonicida* ble rensset og A-lagstypet etter samme prosedyre som hodenyre- og gjellevev. Fra individ bekreftet med blandingsinfeksjon av A-lagstype V og VI i hodenyrevev, ble det fra primærskål sådd ut flere isolat som ble genotypisk A-lagstestet. Dette ble gjort for å forsøke å isolere A-lagstype V og VI fra blandingsinfeksjon.

2.5.3 MLVA

MLVA analyse er en høy-resolusjons typingsmetode som baserer seg på PCR amplifisering av en eller flere VNTR (Variable number of tandem repeats) loki, som visualiseres via gelelektroforese eller kapillærelektroforese. VNTR er repeterende og forholdsvis ustabile sekvenser, som kan vise forskjeller hos bakterieisolat på bakgrunn av opptak eller tap av en eller flere repeterende sekvenser, og har vært brukt i blant annet epidemiologiske studier av patogene bakterier (van Belkum, 1999, Abayneh et al., 2014). En upublisert MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis) for *A. salmonicida*, utarbeidet av Veterinærinstituttet i Oslo, ble brukt for å undersøke homo- og hetrogenitet hos A-lagstype V og VI isolat i studiet. Det ble analysert 40 isolat fra 26 rognkjeks og leppefisk i studiet, 31 isolat representerte A-lagstype VI og resterende 9 isolat representerte A-lagstype V. Vaksinstammene for A-lagstype V og VI ble MLVA-analysert.

For å undersøke stabiliteten av VNTR loki hos A-lagstype VI, ble et kjent smitteisolat av A-lagstype VI passert gjennom rognkjeks og isolert fra hodenyre hos elleve individ (Henriette Nordstrand, smitteforsøk). Andre og femte passasje etter isolering fra hodenyre, ble MLVA-

analysert og sammenlignet mot hverandre og mot det opprinnelige smitteisolatet. Dette ble gjort for å observere om antall repeterende sekvenser ble endret ved passering gjennom fisk og ved gjentatte passeringer på skål.

MLVA analysen baserte seg på seks primersett (Duncan Colquhoun, Veterinærinstituttet Oslo). En 23µl miks bestående av Qiagen master mix (12,5µl), primer (2,5µl, 0,2µM/primer) og 8 µl vann, ble tilsatt 2µl templat (renset bakterie-RNA) og amplifisert i en Rotor-Gene Q PCR-maskin (Qiagen) ved 95°C i 15 minutter, deretter 35 sykluser med 94°C i 30 sekunder, 58°C i 90 sekunder og 72°C i 90 sekunder. Til slutt ble temperaturen holdt på 72°C i 10 minutter.

En 3 % agarose gel ble laget av 3 gram Certified™ Molecular Biology Agarose og 100 ml TAE-buffer 1x (TAE buffer 50X:20ml i 980ml MiliQ vann), og varmet i mikrobølgeovn til gjennomsliktig løsning. Gelløsningen ble tilsatt 10µl GelRed (Biotium), og støpt med en 20 brønners kam. For elektroforesen ble det benyttet 1x TAE buffer. 2µl sample buffer (BioRad) og 8µl prøvemateriale ble blandet og tilsatt i brønnene. Første og siste brønn var 2µl sample buffer og 6µl Ez Load™ 100 bp Molecular Ruler, (80µg/ml BioRad). Gelen ble fotografert (ChemiDoc XRS+) etter fem og seks timer på 40 V. Bildene ble behandlet i Image Lab™ Software 5.2. Isolat fra smittetesten ble visuelt sammenlignet i ImageLab. Isolat fra studiet ble retestet for å bekrefte antatt gruppering. Resultat fra isolat tilknyttet studiet ble fremstilt i et eBURST-diagram (<http://eburst.mlst.net>). For å fremstille eBURST-diagrammet ble hvert isolat gitt en MLVA-profil bestående av en serie av seks tall, hvor hvert tall representerte en unik allele og hvor 0 indikerte manglende bånd/loki.

2.5.4 16S rRNA-SEKVENSERING

Bakterier som var vanskelig å identifisere ved fenotypisk undersøkelse, ble sekvensert. Rør med Big Dye og sekvenseringsbuffer ble levert og analysert hos sekvenseringslaboratoriet på Universitetet i Bergen (Thormøhlens gt. 55, Bergen). Primere brukt til sekvensering av 16S er vist i tabell 2.7. En mastermix (appendiks 2) tilsatt 5µl templat (renset bakterie-RNA), ble amplifisert i PCR på 50°C i 30 min, 95°C i 15 min, og deretter 40 sykluser på 95°C i 15 sek, 50°C i 30 sek og 72°C i 60 sek. Tilstedeværelse av produkt ble bekreftet på en agarosegel (1% agarose + 100ml TAE buffer 1x). Sample buffer 2µl og 8µl prøve ble tilsatt i brønnene, mens første og siste brønn var tilsatt 2µl samle buffer og 6µl Ez Load™ 100 bp Molecular Ruler,

(80µg/ml BioRad). Gelen sto i 75V i 30 minutter, og ble fotografert og fremstilt på Image Lab™ Software 5.2. For positive prøver ble 1µl ExoSAP-IT reagens og 2,5µl templat rensset med PCR i 15 minutter på 37°C, og 15 minutt i 80°C.

Big Dye mix med forward og reverse primer ble laget i separate rør med 1µl sekvensbuffer, 1µl Big Dye, 1µl primer, 1µl templat og 6µl RNasefritt vann, og kjørt i PCR på 96°C i 5 minutter, 25 sykluser med 96°C i 10 sek, 50°C i 5 sek og 60°C i 4 minutter. 10µl RNase fritt vann ble tilsatt i hvert rør før levering til sekvenslaboriet. BLAST ble brukt for å bestemme sekvensenes identitet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabell 2.7 Primere brukt til 16S rRNA-sekvensering.

Sekvensering	Primer	
	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
16 S sekvensering	GWATTACCGCGGCKGCTG	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

2.5.5 HISTOLOGI

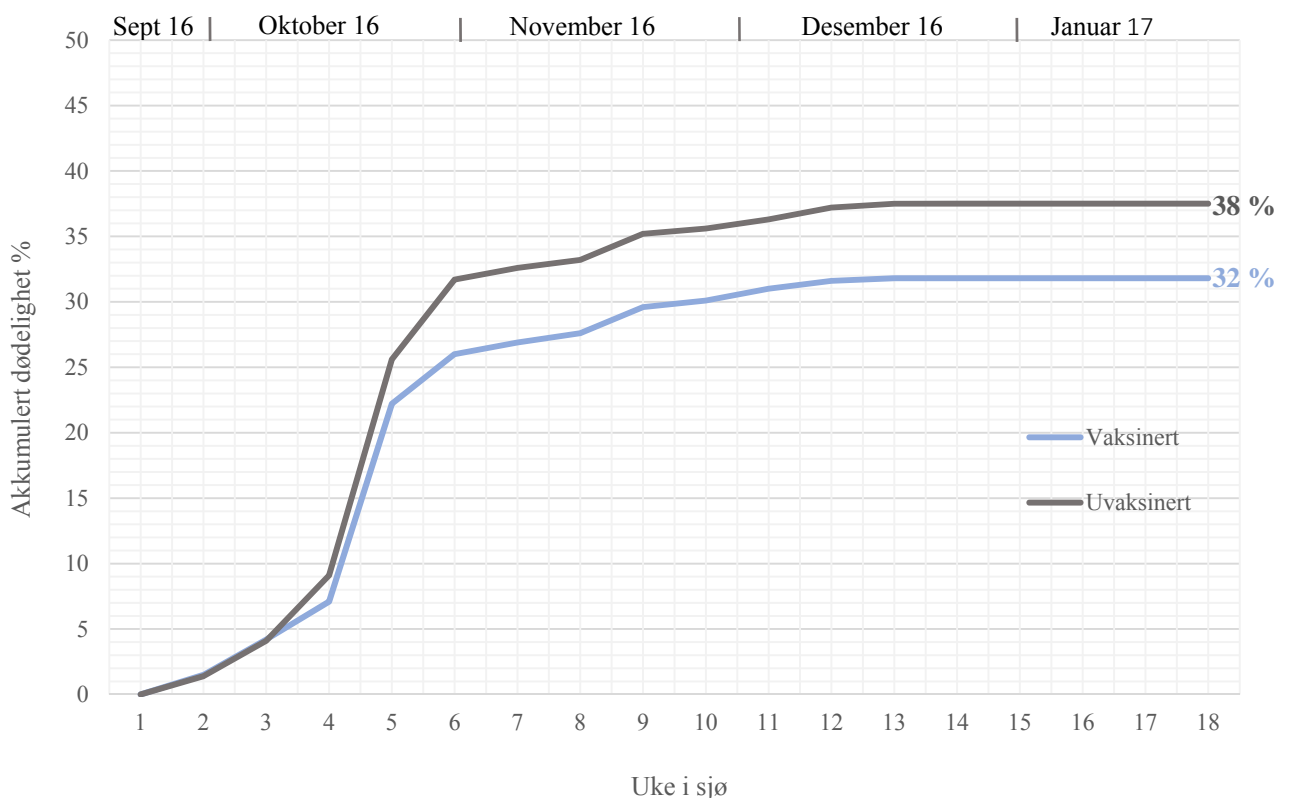
Formalinfiksert vevsprøvene ble støpt i parafinvoks, snittet og farget med haematoxylin og eosin (HE) hos Veterinærinstituttet i Bergen. Analysing av snittene ble gjort i samarbeid med fiskehelsebiolog og veileder Øyvind Vågnes (Vaxxinoa Norway AS). Vevsforandringer ble dokumentert gjennom notater og fotografering av vevssnitt i mikroskop.

3 RESULTAT

3.1 DØDELIGHET HOS ROGNKJEKS

Dokumentert dødelighet fra vaksineringsstidspunkt til utsett i sjø var <0,05% i begge rognkjeksgruppene.

Dødelighet i sjø inntraff få uker etter utsett (figur 3.1). Rognkjeks ble ikke observert ved dødfiskopptak fra uke 14, eller ved avlusning og i fangstteiner fra uke 16-18 i sjø. Feltoppfølgning ble avsluttet etter 18 uker i sjø, grunnet tom beholdning av rognkjeks i anlegget. Et siste planlagt prøveuttak (nr. 6) ble derfor ikke gjennomført. Ved studiets avslutning var den dokumenterte dødeligheten 32% for vaksinert og 38% for uvaksinert rognkjeks, og den udokumenterte dødeligheten (svinnet) utgjorde dermed 68% (V) og 62% (UV). Dokumentert dødelighet på merdnivå var 23-52%, og svinnet 48-77 % (tabell 3.1).



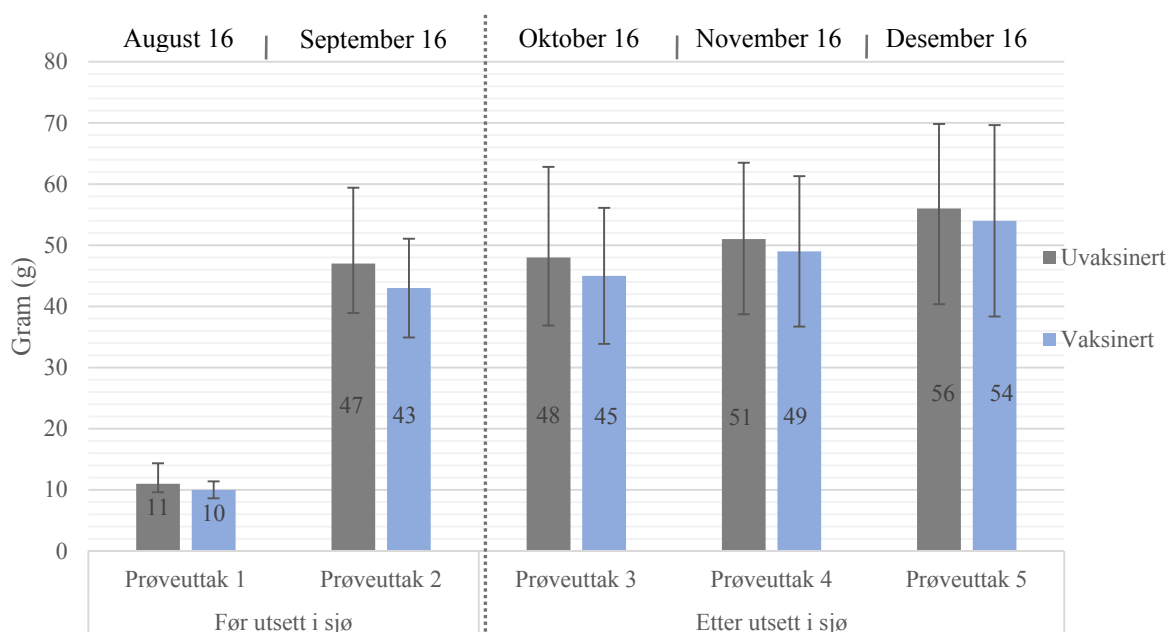
Figur 3.1 Akkumulert dokumentert dødelighet (%) for vaksinert (V) og uvaksinert rognkjeks (UV) fra utsett i sjø til avslutning av feltoppfølgning.

Tabell 3.1 Akkumulert dokumentert og udokumentert dødelighet av vaksinert (V) og uvaksinert (UV) rognkjeks på merdnivå i sjø.

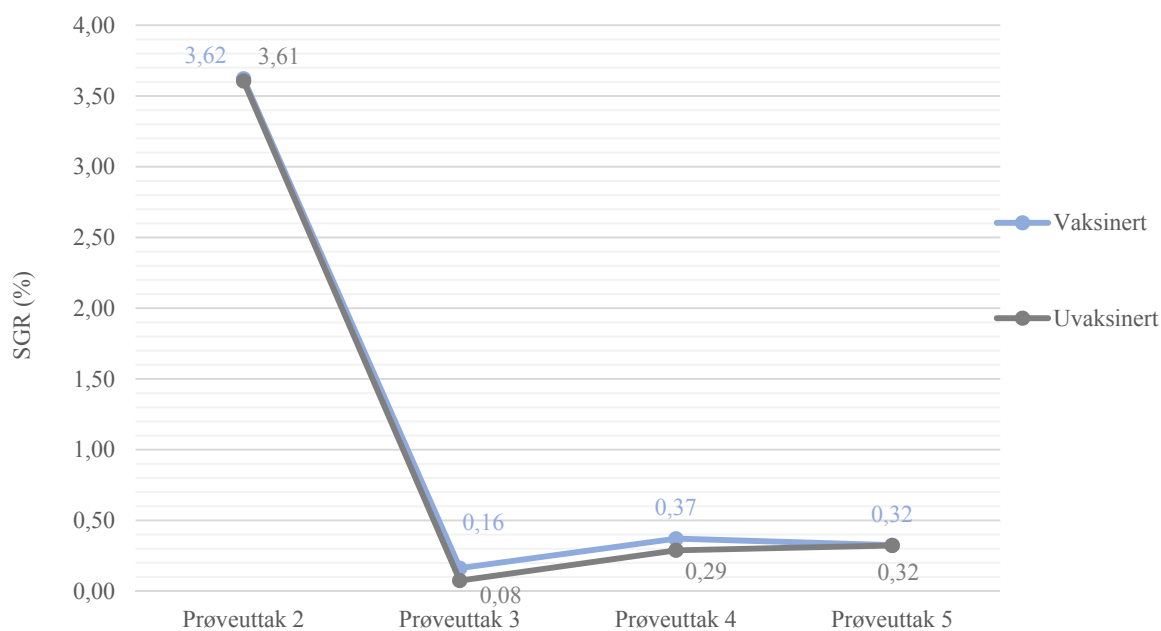
	Merid 1 (UV)	Merid 2 (V)	Merid 3 (UV)	Merid 4 (V)	Merid 6 (V)	Merid 7 (UV)	Merid 8 (V)
Akkumulert dokumentert dødelighet (%)	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Akkumulert udokumentert dødelighet (svinn) (%)	48,2	58,2	66,6	70,6	66,4	72,1	77,0

3.2 VEKT

Figur 3.2 viser vektutviklingen til vaksinert og uvaksinert rognkjeks ved studiets fem vektregistreringer. Dagen før utsett i sjø (prøveuttak 2) var gjennomsnittsvekten 43 (V) og 47 (UV) gram, og tolv uker senere 54 (V) og 56 (UV) gram (prøveuttak 5). I sjøperioden vokste vaksinert rognkjeks med 26% og uvaksinert rognkjeks med 19%. Før utsett i sjø var prosentvis daglig tilvekst (SGR) 3,62% hos vaksinert og 3,61% hos uvaksinert rognkjeks (figur 3.3). Rognkjeksens samlede SGR i sjøperioden var 0,30% (V), og 0,23 % (UV).



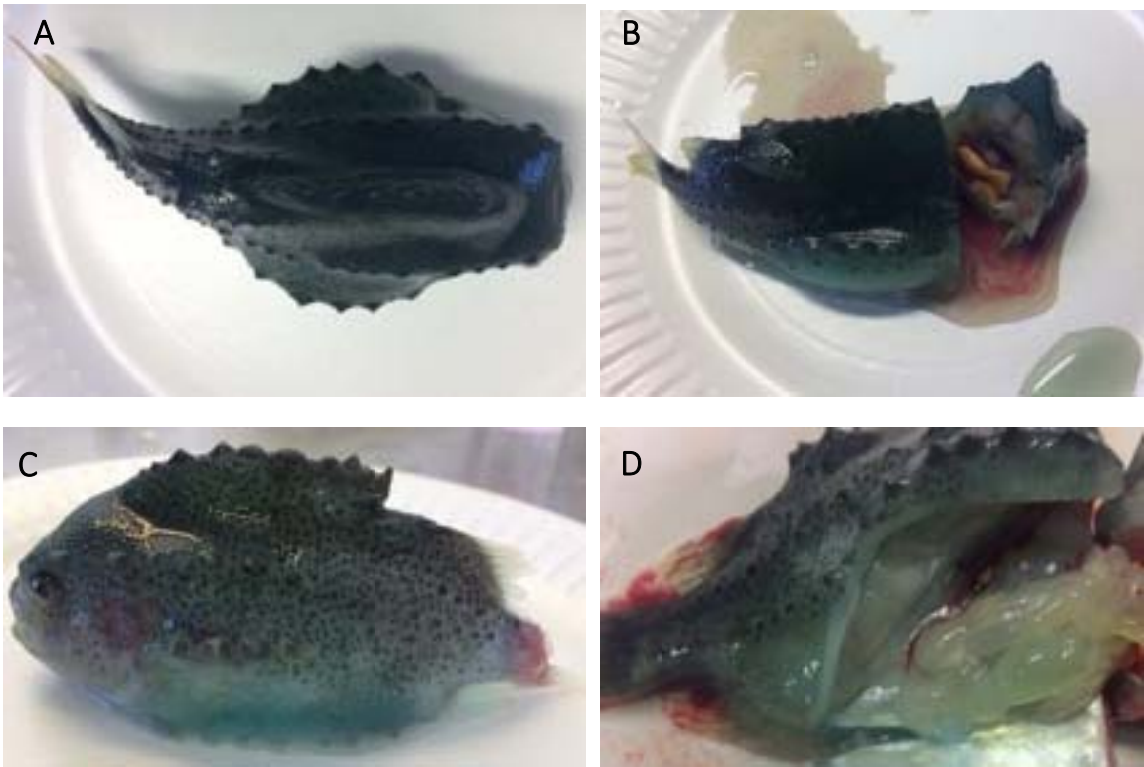
Figur 3.2 Vektutvikling (g) hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks ved fem vektregistreringer. Stiplet linje = sjøsetting. Standardavvik f.v: 11±3,36, 10±1,38, 47±12,41, 43±8,07, 48±14,81, 45±11,12, 51±12,50, 49±12,30, 56±13,84, 54±15,65.



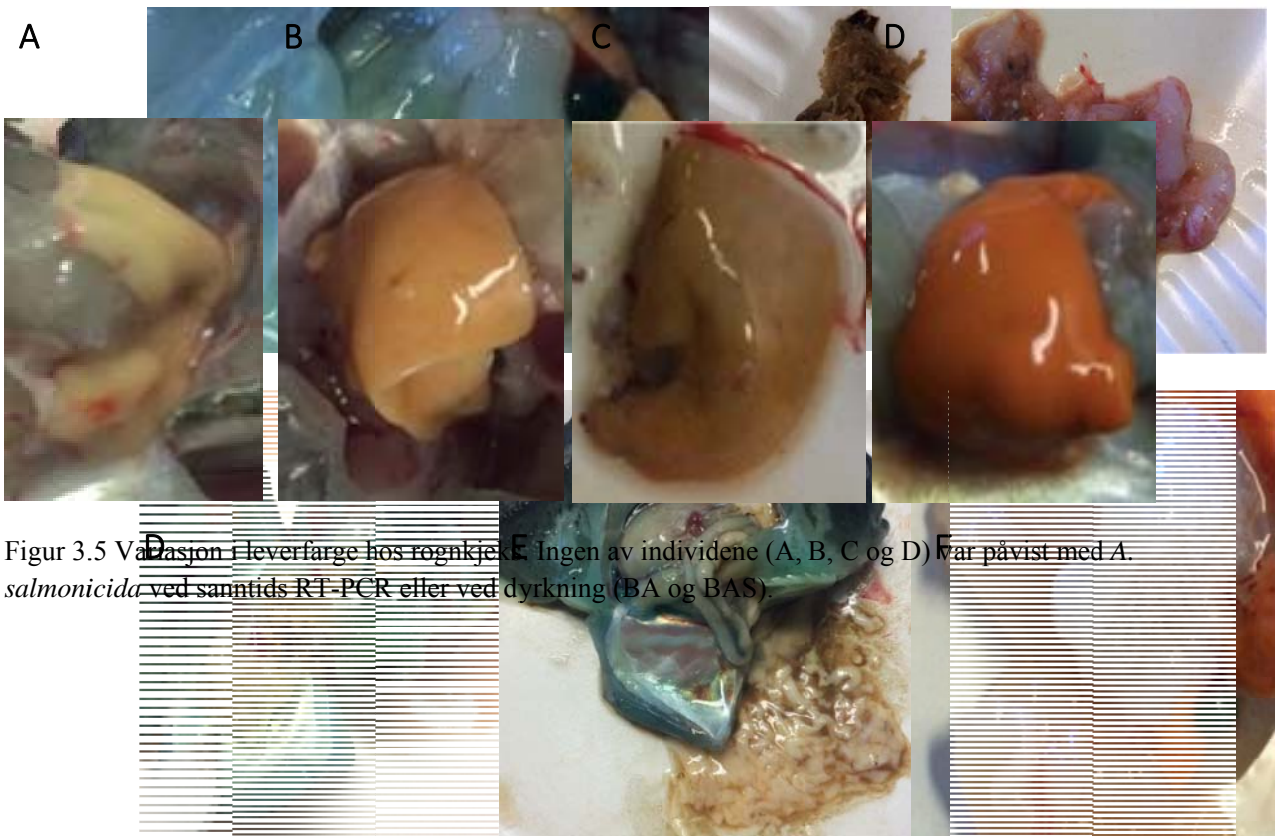
Figur 3.3. Daglig tilvekst % (SGR) hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks.

3.3 KLINISK UNDERSØKELSE

Det ble ikke observert ytre sår, skader eller indre tegn til patologi før utsett i sjø. Det var tilsynelatende ingen klinisk forskjell mellom gruppene i studiet, annet enn vaksinebivirkninger. Ved samtlige prøveuttak etter utsett i sjø hadde et fåtall individ sår på siden, rygg eller halerot. En rekke individ hadde ascites og væske i mage og tarm ved første prøveuttak i sjø (figur 3.4). Et fåtall individ ble observert med føde. Andelen individ med ascites minsket, og mageinnhold økte, ved prøveuttak 4 og 5 (figur 3.6). Lever- og nyrefarge varierte i mørkhetsgrad (figur 3.5). Det ble ikke observert granulom i nyrevev. Blødninger i indre organ ble observert hos noen individ. Gonader var synlig ved første prøveuttak i sjø (figur 3.7).



Figur 3.4. Utstående buk (A) med ascites (B). Sår på side og halerot (C). Væske i tarm (D).



Figur 3.5 Variation i leverfarge hos rognkjek. Ingen av individene (A, B, C og D) var påvist med *A. salmonicida* ved samtidige RT-PCR eller ved dyrkning (BA og BAS).

Figur 3.6 Mage- og tarminnhold hos rognkjeks i sjø (prøveuttak 3, 4 og 5). Prøveuttak 3: dominert av væskefylt tarm (A) og noe groe (B). Prøveuttak 4: dominert av groe (B), men også væske (A) og fåtall med pellet (D) Prøveuttak 5: dominert av rekelignende strukturer (C) og groe (B), og et fåtall med pellet (D), væske (A) eller hvitliggende substans (F). Bendelorm (E) var tilstede i ett til rognkjeks/prøveuttak.

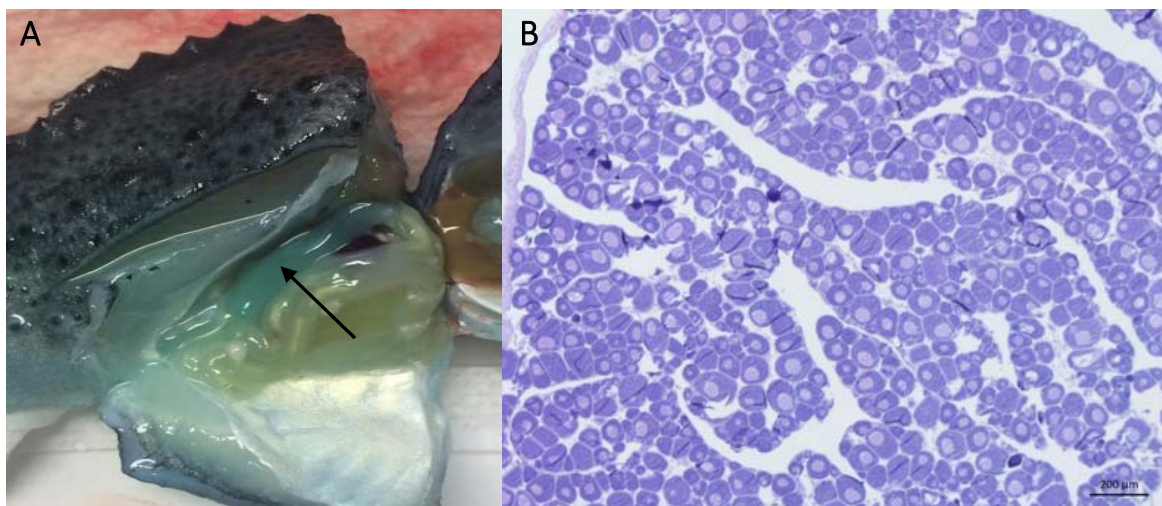
3.4 DIAGNOSTISERING AV *AEROMONAS SALMONICIDA*

3.4.1 FENOTYPISK TYPING OG GENOTYPISK A-LAGSTYPING AV BAKTERIEISOLAT

Det var ingen dyrkningsfunn av *A. salmonicida* før utsett i sjø. Etter utsett i sjø ble bakterien dyrket fra vaksinert og uvaksinert rognkjeks, og leppefisk (figur 3.8). Prevalens av *A. salmonicida* fra bakterieisolat etter utsett i sjø var 18% for vaksinert rognkjeks, 10% for uvaksinert rognkjeks og 10% for leppefisk.

Genotypisk A-lagstyping av *A. salmonicida* bakterieisolat i studiet viste at 85% tilhørte A-lagstype VI, 5% A-lagstype V og 10 % blandingskultur med A-lagstype V og VI. A-lagstype V ble kun påvist fra leppefisk. Fra individ med blandingskultur ble det sådd ut flere isolat for mulig å isolere A-lagstype V og VI. A-lagstype V ble isolert ved noen tilfeller, men de fleste kolonier sådd videre fra primærskål viste blandingskultur ved genotypisk A-lagstyping.

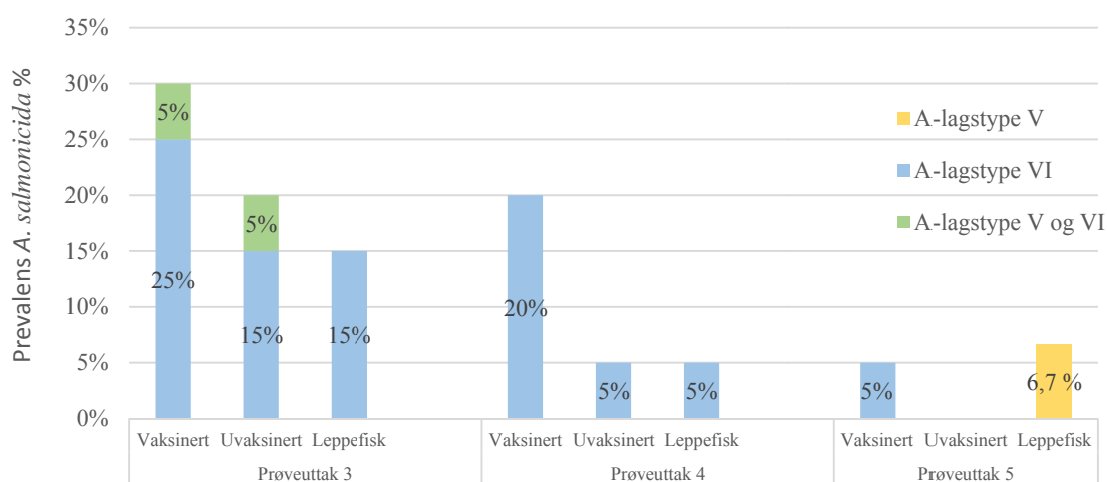
Etter to til tre dager inkubering på BA og BAS opptrådte *A. salmonicida* som tørre, konvekse, skyvbare, og gråhvite pinpoint-kolonier. Samtlige *A. salmonicida* isolat var oksydase-positive og negativ for 0/129. A-lagstype VI fremviste pigmentproduksjon, som ikke ble observert hos A-lagstype V (figur 3.9). Noen enkeltkolonier hos A-lagstype VI var større, mer hvitaktig, og



Figur 3.7 Grønnlig struktur dorsalt i bukhulen (A) identifisert som gonader ved hjelp av histologi (B). Gonadene (A) (B) er hentet fra fisk på 38 gram.

ikke skyvbare.

Fenotypisk typing viste biokjemiske forskjeller mellom A-lagstype V og VI for NO₃ (nitratreduksjon), GEL (gelatin hydrolysering) og PNPG (β-galaktosidase) i API 20 NE testen. For API 20 E var det forskjeller i VP (acetoin produksjon), GEL (gelatin hydrolysering) og AMY (amygdalin fermentering/ oksydering) (tabell 3.2).



Figur 3.8 Prevalens av *A. salmonicida* og A-lagstype V og VI fra hodenyreutstryk på blodagar eller blodagar med NaCl. Figuren viser vaksinert og uvaksinert rognkjeks og leppefisk, ved uttakene etter utsett i sjø. Figuren utelater prøveuttak 1 og 2 ettersom dyrking av *A. salmonicida* var negativ.



Figur 3.9 A-lagstype VI (A) produserte pigment, mens A-lagstype V var pigmentløs (B) for samtlige isolat i studiet.

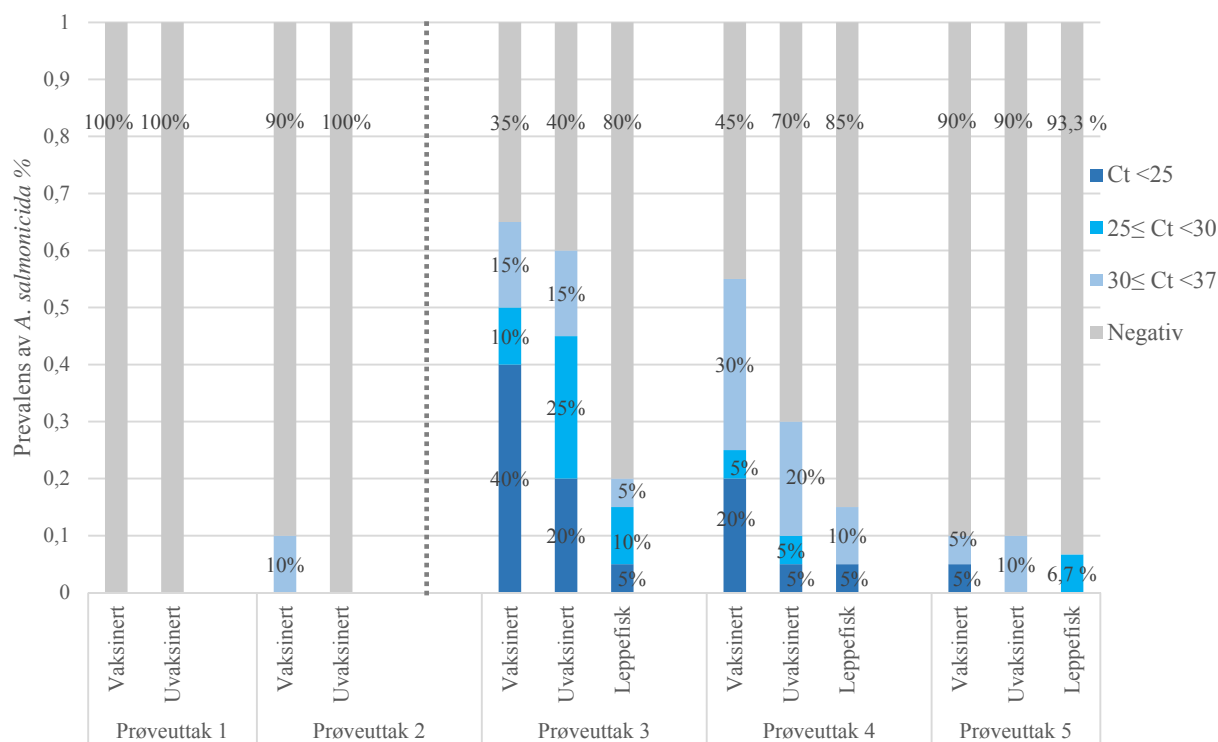
Tabell 3.2 Biokjemiske forskjeller mellom A-lagstype V og VI ved API 20 NE og API 20 E etter 48t inkubering.

Api 20 NE			API 20 E				
	NO ₃	GEL	PNPG		VP	GEL	AMY
A-lagstype V	-	-	+	A-lagstype V	-	-	+
A-lagstype VI	+	+	-	A-lagstype VI	+	+	-

3.4.2 SANNTIDS RT- PCR AV HODENYRE- OG GJELLEVEV

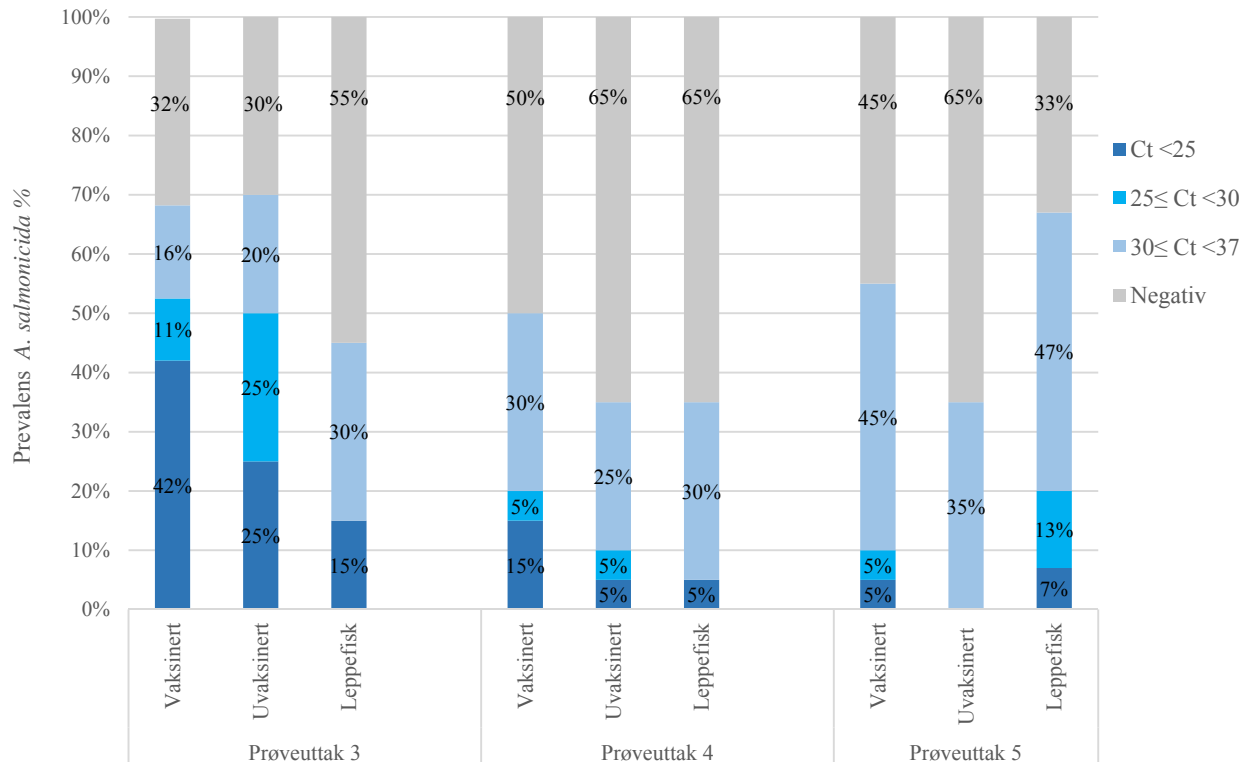
Før utsett i sjø var undersøkt rognkjeks negativ for *A. salmonicida* ved sanntids RT-PCR, med unntak av to vaksinerte rognkjeks med Ct 36,3 og 36,7 ved prøveuttak 2. Retesting av hodenyrevevet ga negativt resultat. PCR analyser viste at *A. salmonicida* var tilstede i hodenyre- og gjellelev hos rognkjeks og leppefisk ved samtlige prøveuttak etter utsett i sjø (figur 310, figur 3.11). Prevalensen i hodenyrevev var størst ved prøveuttak 3.

Prevalens av *A. salmonicida* i hodenyrevev hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks, og leppefisk samlet for hele sjøperioden var 43% (V), 33% (UV) og 14,5% (L). For gjellelev var prevalensen 52% (V), 50% (UV) og 51% (L).



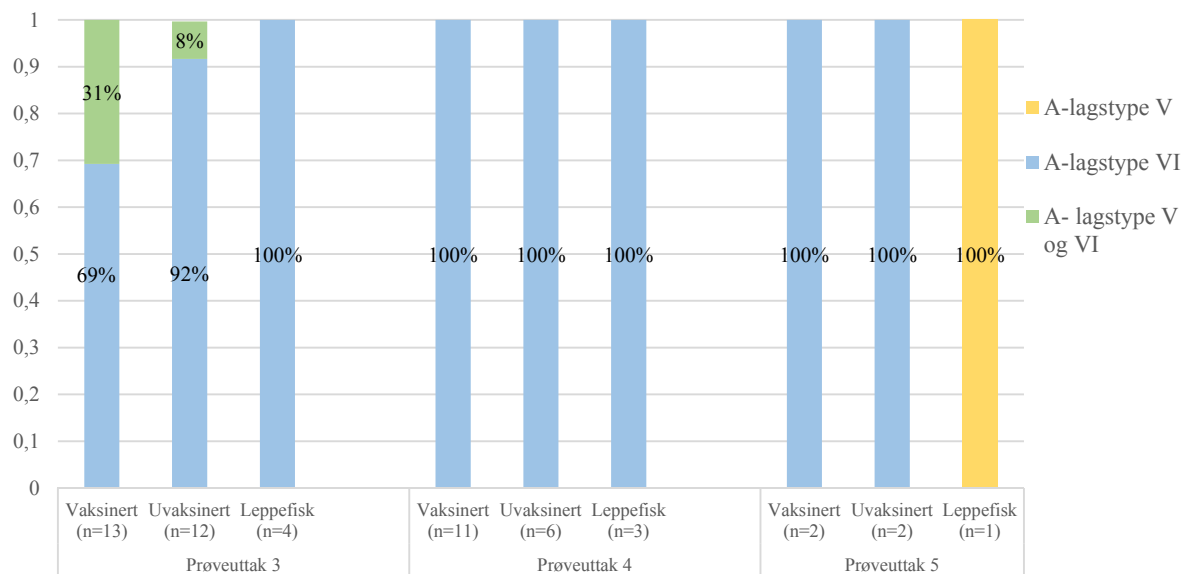
Figur 3.10 Prevalens av *A. salmonicida* fra hodenyrevev hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks og leppefisk ved samtlige uttak i studiet. Stiplet linje = sjøsetting. Ct < 25 indikerer høy smittemengde, 25 ≤ Ct < 30 moderat smittemengde, 30 ≤ Ct < 37 lav smittemengde, og 37 ≤ Ct negativ. Rognkjeks fra prøveuttak 2 var

negative ved retesting. Antall fisk n=20 for samtlige grupper, med unntak av leppefisk fra prøveuttak 5 (n=15).

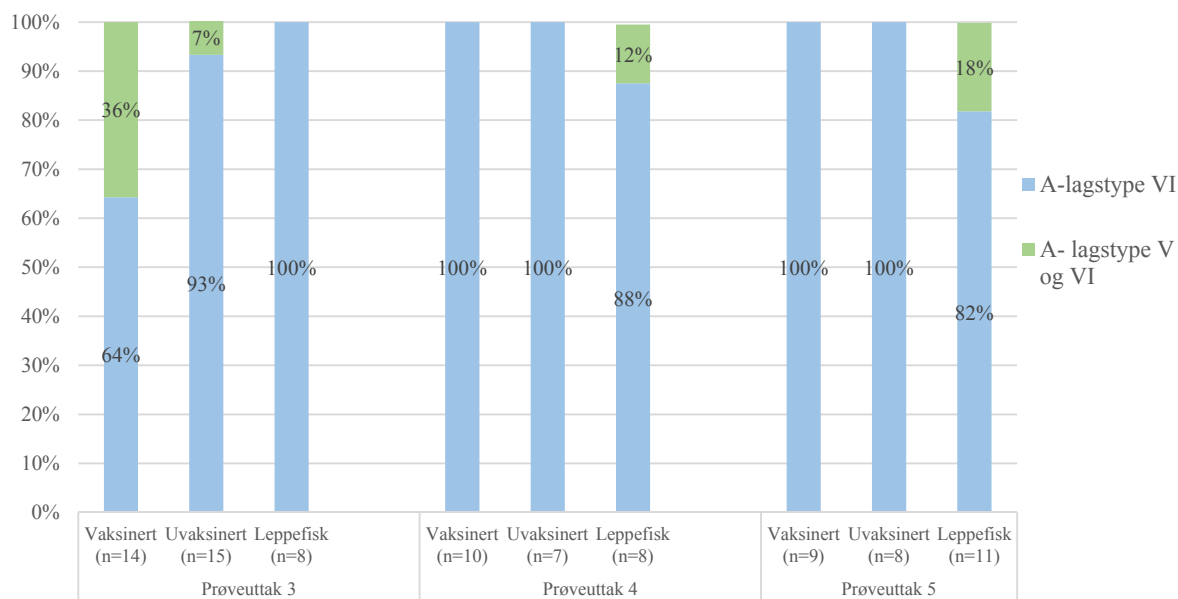


Figur 3.11 Prevalens av *A. salmonicida* fra gjellevev hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks og leppefisk etter utsett i sjø. Ct < 25 indikerer høy smittmengde, $25 \leq Ct < 30$ moderat smittmengde, $30 \leq Ct < 37$ lav smittmengde, og $37 \leq Ct$ negativ. Antall fisk n=20 for samtlige grupper, med unntak av vaksinert prøveuttak 3 (n=19) og leppefisk prøveuttak 5 (n=15).

Fra alt positivt hodenyrevev i studiet utgjorde 89% A-lagstype VI, 2% A-lagstype V og 9% blandingsinfeksjon med A-lagstype V og VI. Fra positivt gjellevev i studiet utgjorde 90% A-lagstype VI og 10% blandingsinfeksjon med A-lagstype V og VI. Figur 3.12 og 3.13 viser prevalens av de to A-lagstypene for hodenyre- og gjellevev hos rognkjeks og leppefisk etter utsett i sjø. I det første uttaket i sjø var 20% av *A. salmonicida* positiv rognkjeks påvist med blandingsinfeksjon av A-lagstype V og VI.



Figur 3.12 Prevalens av *A. salmonicida* A-lagstypene V og VI fra hodenyrevev, påvist ved spesifikk PCR hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks, og leppefisk, etter utsett i sjø.



Figur 3.13 Prevalens av *A. salmonicida* A-lagstypene V og VI fra gjellevev, påvist ved spesifikk PCR hos vaksinert og uvaksinert rognkjeks, og leppefisk, etter utsett i sjø.

3.4.3 MLVA

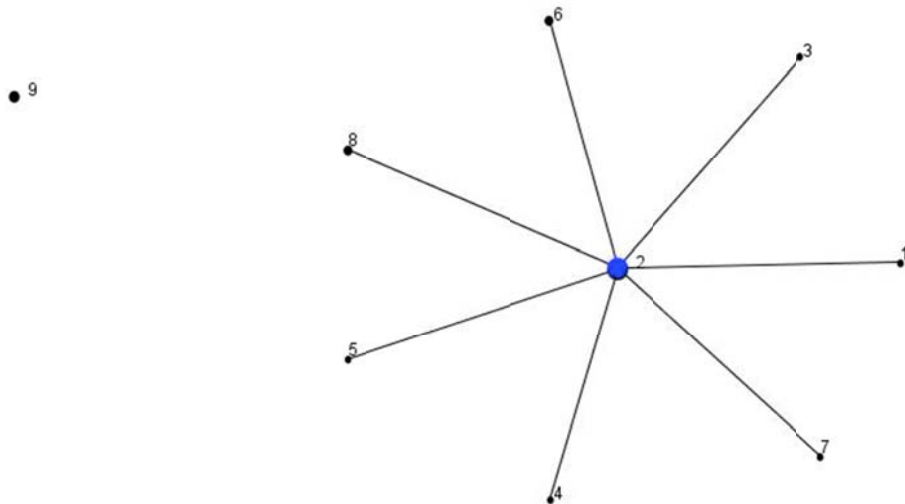
Det ble identifisert ni ulike MLVA-profiler for A-lagstype V og VI fra rognkjeks og leppefisk i studiet (tabell 3.3, figur 3.14). A-lagstype V isolater fremviste kun en MLVA-profil. Resterende åtte profiler opptrådte hos A-lagstype VI. Profilene varierte i ett til tre bånd innen A-lagstype VI. To isolat fra samme fisk (V5/V5-3) fremviste ulike MLVA-profiler.

A-lagstype VI vaksinstammen tilhørte den vanligste MLVA-gruppen i studiet (variant 2, figur 3.14). Vaksinstammen for A-lagstype V var ulik MLVA-gruppen hos A-lagstype V i studiet. Vaksinstammene er ikke inkludert i tabell 3.3 eller figur 3.14.

Det ble ikke observert endringer i MLVA-profil for A-lagstype VI *A. salmonicida* passert gjennom rognkjeks og deretter to og fem passasjer på blodagarskål. Bakterien hadde her uendret MLVA-profil før og etter passering.

Tabell 3.3 MLVA-profiler for *A. salmonicida* isolat i studiet. V=vaksinert, K=uvaksinert og L=leppefisk, isolert fra prøveuttak 3 (P3), prøveuttak 4 (P4) og prøveuttak 5 (P5). MLVA-profilene representerer bånd 1 til 6. Bånd tallgitt som 0 indikerer fravær av båndprodukt. Fisker representert med flere isolat med identisk MLVA-profil, ble representert ved et isolatnummer.

A-lagstype	Variant	MLVA-profil	Antall isolat	Prøveuttak: isolatnummer
VI	1	1-0-1-1-1-1	1	P3: K6
	2	1-0-1-2-1-1	12	P3: V1, V2, V5, V13, V19, V20, K19, K20, L1, L2 P4: K26, L22
	3	1-0-1-3-1-1	1	P3: L20
	4	2-0-1-2-1-1	1	P3: V12
	5	1-0-2-2-1-1	1	P5: V42
	6	1-0-1-4-1-1	2	P4: V24, V27
	7	3-0-1-2-1-1	1	P4: V40
	8	1-0-1-5-1-1	2	P3: V5-3 P4: V21
V	9	1-1-3-2-2-0	3	P3: K10, V10 P5: L45



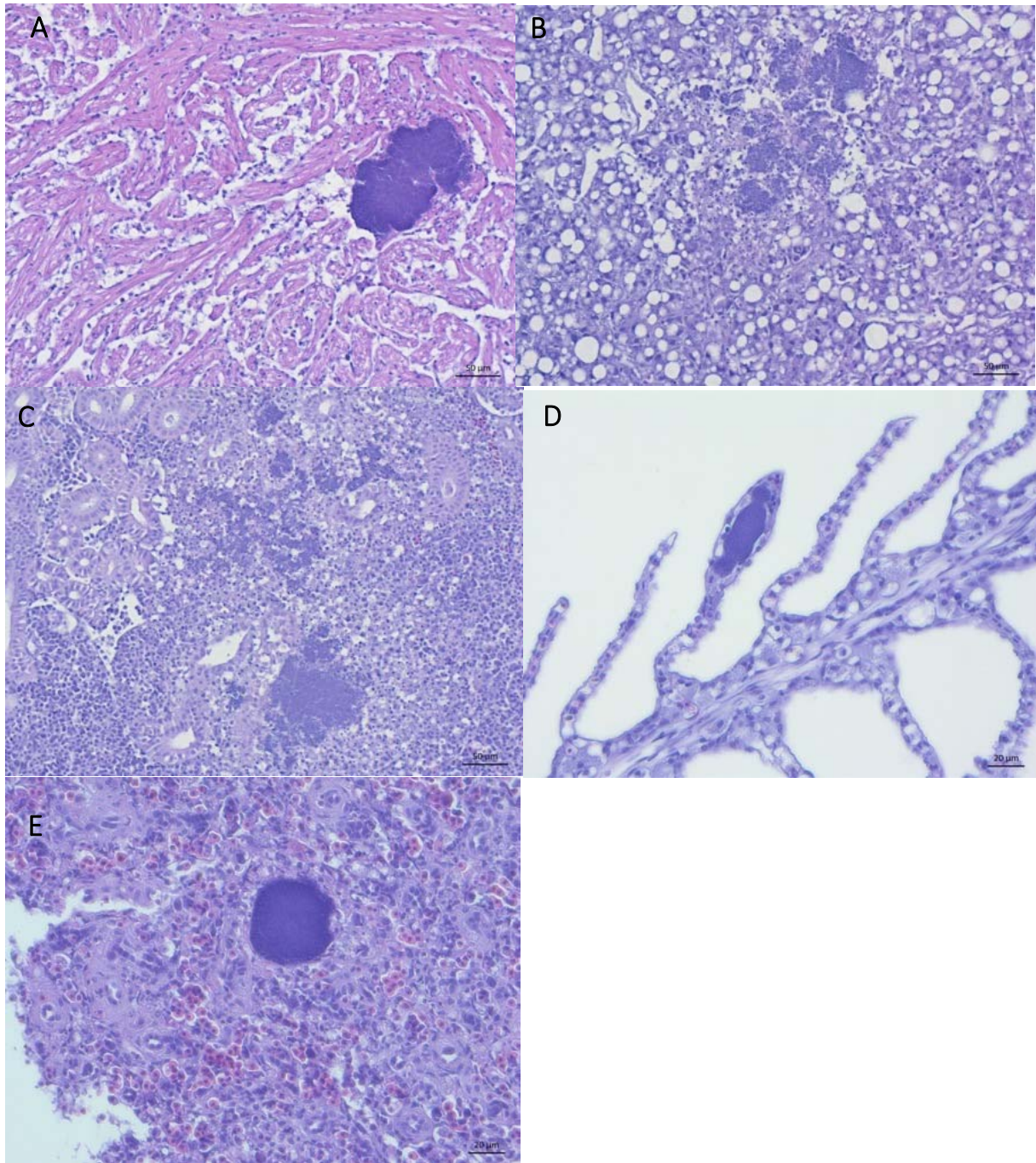
Figur 3.14 Et eBURST diagram for MLVA-profiler av A-lagstype V (variant 9) og VI (variant 1-8) i studiet. Variasjon i et bånd på gelen er indikert vha svarte linjer. Antallet isolat tilhørende de ulike profilene er illustrert ved størrelsen på sirkelen.

3.4.4 HISTOLOGI

Det ble observert histopatologiske mikrokolonier forenelig med atypisk furunkulose i begge rognkjeksgruppene (figur 3. 15). Mikrokolonier ble ikke observert før utsett i sjø, men hos 40% av de undersøkte rognkjeksene (n=22) etter utsett i sjø. Av positive rognkjeks var 55% vaksinert. Mikrokolonier var synlig i hjerte, gjeller, nyre, lever og milt, men varierte i antall organ (tabell 3.4). Omtrent halvparten av de positive individene hadde mikrokolonier kun i gjellevev. Ingen leppefisk (n=7) ble påvist med mikrokolonier.

Tabell 3.4. Vaksinert og uvaksinert rognkjeks påvist med histologiske mikrokolonier etter utsett i sjø.

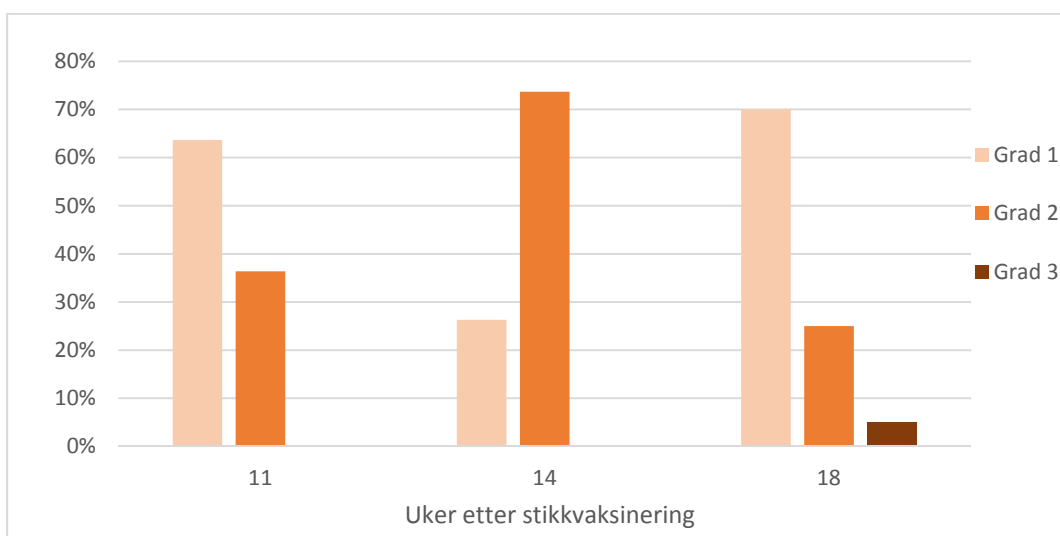
Prøveuttak	Gruppe	Individ	Mikrokoloni i vev	Ct-verdi nyrevev	Ct-verdi gjellevev
Prøveuttak 3	Vaksinert	V13	Gjeller	30,31	28,89
		V16	Gjeller, milt, nyre	24,19	24,49
	Uvaksinert	K13	Gjeller, milt	25,34	29,10
		K14	Gjeller, milt, hjerte, nyre, lever	19,86	15,93
Prøveuttak 4	Vaksinert	V27	Gjeller, milt, hjerte, nyre, lever	14,98	19,11
	Uvaksinert	K32	Gjeller	29,62	22,49
Prøveuttak 5	Vaksinert	V41	Gjeller	Neg.	25,05
		V42	Gjeller, milt, hjerte, nyre, (lite lever på snittet –ikke analysert)	20,34	20,52
	Uvaksinert	K49	Gjeller	35,99	32,40



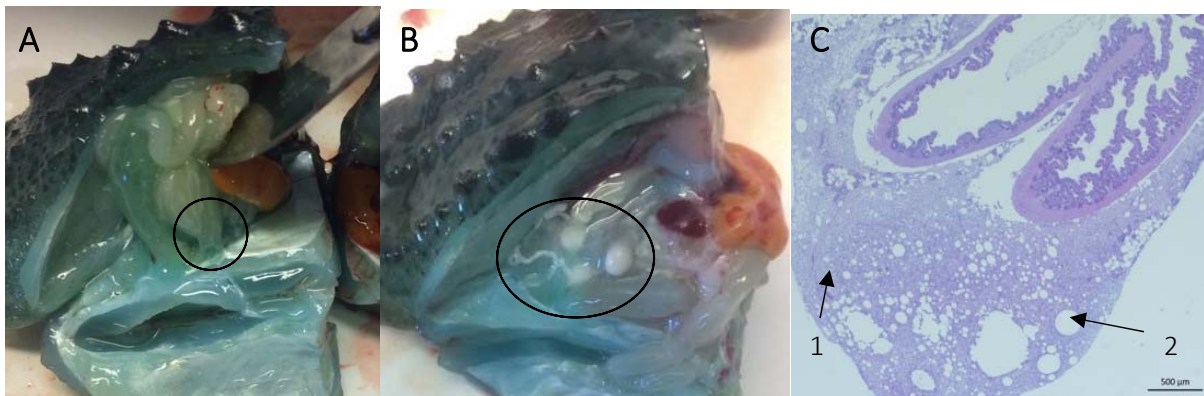
Figur 3.15. Mikrokolonier forenelig med *A. salmonicida* i hjerte (A), lever (B), nyre (C), gjelle (D) og milt (E).

3.5 VAKSINEBIVIRKNINGER

Vaksinert rognkjeks fremviste vaksinerester og adheranse i bukhalen (figur 3.17). Med unntak av et individ fremviste alle de undersøkte rognkjeksene vaksinerester (grad 1-2), som lå hovedsakelig i bakre del av bukhalen. Adheranse var tilstede i samtlige individ, grad 1-3 (figur 3.16). Den mest fremtredende adheransen ble observert i ventral del av bukhalen (region 3). Dorsal del av bukhalen (region 2) fremviste lavere grad av adheranse enn region 3. Kranial del av bukhalen (region 1) fremviste ingen adheranse. Det var ingen tegn til melanindeponering, verken i bukorgan eller muskel. Ved histologisk undersøkelse ble det observert individ med vaksinit (vaksineindusert betennelse) og vaksinedråper (figur 3.17).



Figur 3.16 Grad av adheranse hos undersøkte vaksinert rognkjeks ved prøveuttak 3, 4 og 5, henholdsvis 11, 14 og 18 uker etter stikkvaksinering.



Figur 3.17 Vaksinebivirkninger viste adheranse i bukhalelokaltet 3 (A) og 2, vaksinerester (B). Betennelse (vaksinit) (1) og vaksinedråper (2) var synlig histologisk (C).

3.6 ANDRE FUNN

3.6.1 BAKTERIEDYRKING

Det ble identifisert *Vibrio* spp., *V. anguillarum* O1, *Pasteurella* sp. og *Photobacterium* sp. hos rognkjeks i studiet (tabell 3.5). Én leppefisk fikk identifisert *Carnobacterium* sp.

Pasteurella sp. vokste kun på BAS, hadde små, grålige til gjennomsiktige, sentvoksende kolonier. Alfahemolyse var synlig etter en ukes inkubering ved 15°C.

Tabell 3.5 Dyrkningsfunn av andre bakterier enn *A. salmonicida* på BA og BAS fra fisk i studiet. Alle individene var i tillegg diagnostisert med *A. salmonicida*, med unntak av tre individ merket med *

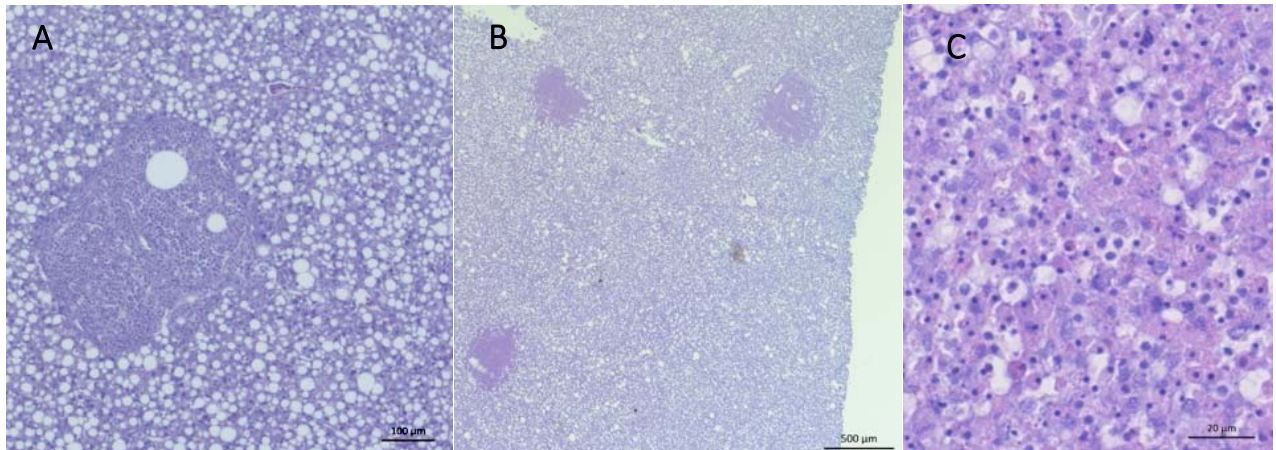
Prøveuttak	Gruppe	Vibrio spp.	<i>V. anguillarum</i> O1	<i>Pasteurella</i> sp.	<i>Photo-bacterium</i> sp.	<i>Carno-bacterium</i> sp.
Prøveuttak 2	Vaksinert	1*	0	0	0	0
Prøveuttak 3	Vaksinert	5*	1	1	1	0
	Kontroll	0	2	0	1	0
Prøveuttak 4	Vaksinert	1	0	0	0	0
	Leppefisk	0	0	0	0	1*

3.6.2 HISTOLOGI

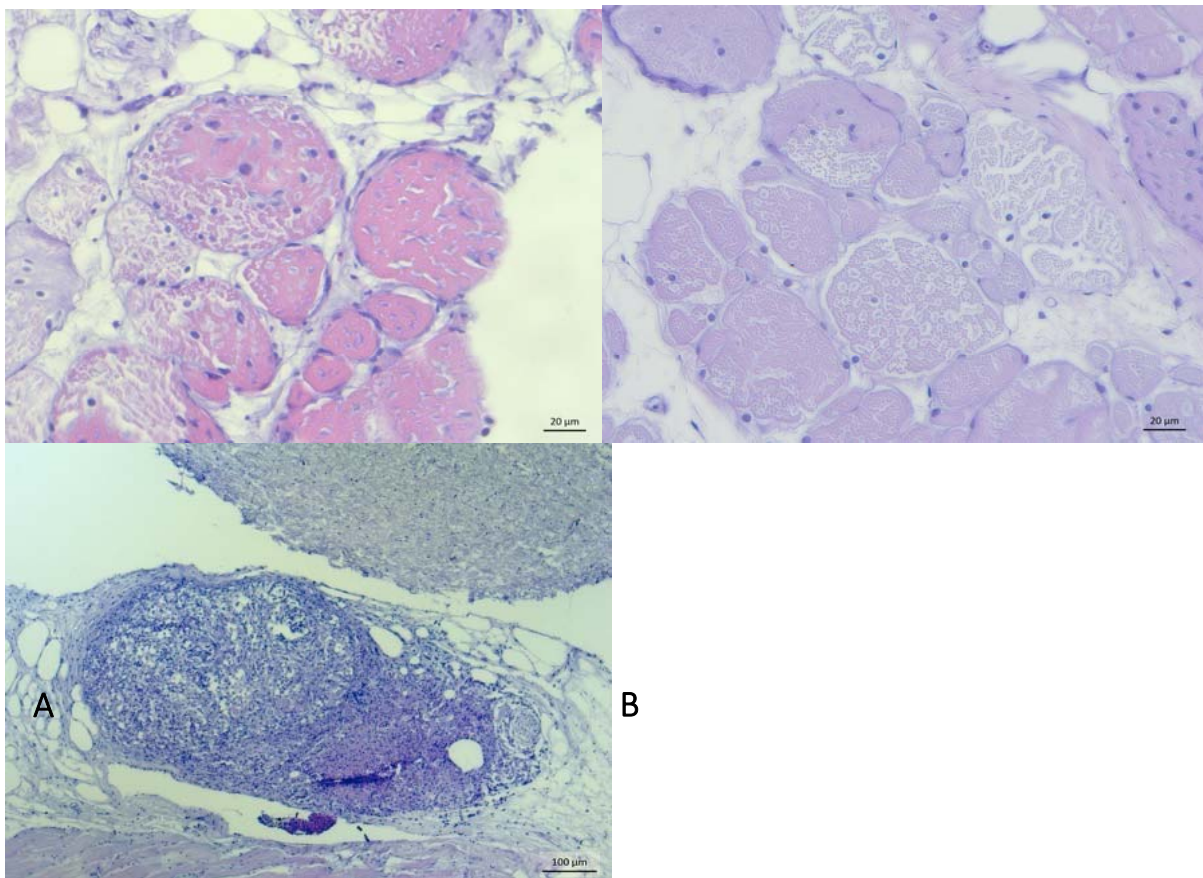
Leverforandringer opptrådte i begge rognkjeksgrupper. Forandringene kunne ikke knyttes til infeksjon med *A. salmonicida* (PCR). Leverforandringene opptrådte som mørke celleansamlinger lokalisert i multifokale ”øyer”, med betennelsesceller, eosinofile granulære celler, og tidvis blødning og nekrose (figur 3.18). Leverforandringer var synlig både før og etter utsett av rognkjeks. Lumpfish Flavivirus infeksjon ble avkreftet etter PCR undersøkelse av rognkjeks (n=20) og leppefisk (n=10) hos Pharmaq Analytic (Thormøhlens Gate 55, Bergen).

Det ble observert muskelforandringer i rognkjeks fra prøveuttak 4 og 5, med degenerert skjelettmuskulatur og sentralisering av cellekjerner i muskelfibrene (figur 3.19). Individene var både positiv og negativ for *A. salmonicida* (PCR). En berggytt ble observert med lignende strukturer i muskel. Ett individ fremviste betennelse mellom bindevevslaget og skjelettmuskulaturen (figur 3.19)

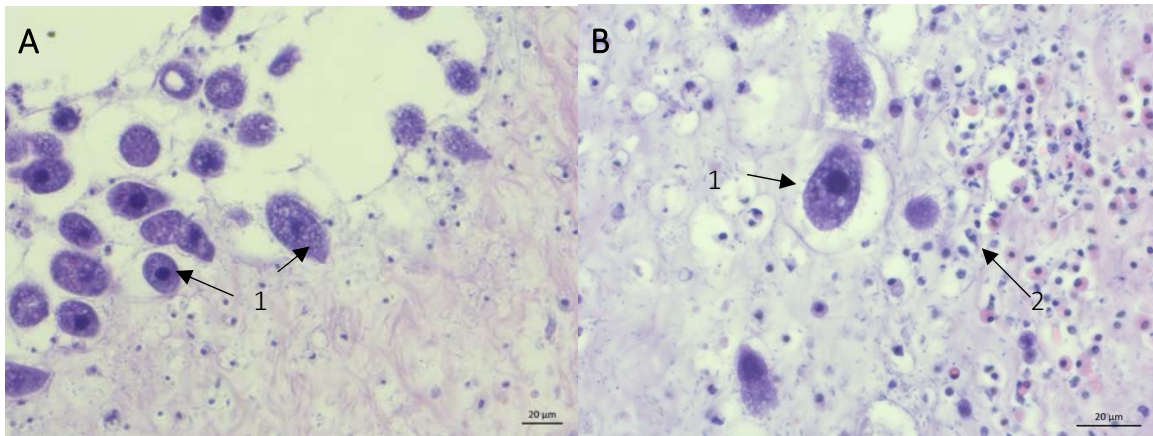
Parasitter ble observert fra såroverflate fra en rognkjeks (figur 3.20).



Figur 3.18 Leverforandringer med multifokale celleansamlinger (A) (B), betennelse, nekrose, blødning, og eosinofile granulære celler (C).



Figur 3.19 Muskelforandringer (A) (B) hos rognkjeks ble sett i samtlige prøveuttak etter utsett i sjø. Betennelse mellom bindevev og skjelettmuskulatur (C) var synlig i et individ.



Figur 3.20. Sårvev hos rognkjeks infisert med parasitter (1) i hudoverflaten (A) og i dermis (B). En betennelsesreaksjon i bindevevslaget med tilstrømning av betennelsesceller (2).

3.7 MILJØ- OG DRIFTSOBSERVASJONER

Ved sjøutsett var vanntemperaturen i anlegget 16°C og saliniteten varierte fra 11-29‰ (0,5-10 meter dybde) (appendiks 3). Lokaliteten var strømsterk, og oppdrettere rapporterte at død og levende rognkjeks ble presset mot notveggen i perioder med sterk strøm. Fôring var utfordrende, hovedsakelig grunnet overflatefôring i kombinasjon med sterk strøm.

3.8 VILLFANGET LEPPEFISK

Villfanget leppefisk i anlegget ble diagnostisert med atypisk furunkulose (histologi) en måned før rognkjeks ble sjøsatt.

4 DISKUSJON

Rognkjeks brukes som biologisk avlusning av oppdrettslaks, men bakterielle problem har forårsaket høy dødelighet etter utsett i sjø (Bornø & Gulla, 2017). Behovet for vaksiner er stort, men også ernæring og miljø er antatt å være avgjørende faktorer for dødelighetsbildet (Bornø & Gulla, 2017). Målet med studiet var å kartlegge prestasjonen til rognkjeks vaksinert mot *A. salmonicida* type V og VI, og *V. anguillarum* O1. Dette ble gjort ved feltoppfølging av en vaksinert og en uvaksinert gruppe rognkjeks satt ut i et kommersielt lakseproduserende anlegg.

Generelt er feltstudier utsatt for en rekke uforutsette og ukontrollerbare forhold som kan påvirke resultatene i varierende, og ofte ukjent, grad. Årsak til sykdom og dødelighet i felt er gjerne multifaktorielle, og det er sannsynlig at både biotiske og abiotiske faktorer bidro til det totale sykdoms- og dødelighetsbildet i studiet.

4.1 ATYPISK FURUNKULOSE OG DIAGNOSTISERING AV *AEROMONAS SALMONICIDA*

Ved hjelp av sanntids RT-PCR, bakteriedyrking (BA/BAS) og histologi ble *A. salmonicida* diagnostisert hos begge rognkjeksgruppene i studiet. Prevalensen av atypisk furunkulose var størst fem uker etter utsett i sjø og indikerer at rognkjeks ble infisert like etter utsett. Dette sammenfaller med dødelighetstrenden i studiet. Dobbelt så mange individ var positive ved PCR analysering sammenlignet med bakteriedyrking. Dette viser at sanntids RT-PCR er mer sensitiv enn dyrking, og kan fange opp infeksjon og smitte på et tidlig stadium (Gulla et al., 2015). PCR-metoden i arbeidet ikke var optimalisert med hensyn på å være kvantitativ, og Ct-verdiene ga kun indikasjoner på infeksjonsgrad hos fisken.

Sanntids RT-PCR av *A. salmonicida* i hodenyrevev viste at prevalensen var høyere hos vaksinert rognkjeks (43%) enn uvaksinert rognkjeks (33%) i sjø. Bakteriedyrking viste samme trend, med en samlet prevalens på 18% hos vaksinert rognkjeks og 10 % hos uvaksinert rognkjeks. Dette kan indikere at vaksinert rognkjeks ble infisert i større grad enn uvaksinert. Årsak til dette er ukjent. Vaksinerelatert *A. salmonicida* kan potensielt gi en høyere prevalens i hodenyrevev, ettersom PCR kan fange opp formalindrepte bakterier fra vaksinen. Fra settefiskanlegget var to vaksinerte rognkjeks svakt positiv for bakterien. Dette

var et overraskende lavt antall ettersom vaksinerelatert påvisning er vanlig etter vaksinerings, og vist hos oppdrettet berggyllt ved bruk av samme vaksine (Fløgum, 2016). PCR påviser nukleinsyremateriale, mens bakteriedyrking krever levende bakterier. Vaksinerelatert *A. salmonicida* kan derfor ikke forklare en høyere dyrkningsprevalens hos vaksinert rognkjeks. Prøveuttakene indikerte prevalensen ved gitte tidspunkt i sjøfasen. Dette kan være en mulig forklaring på variasjonene mellom vaksinert og uvaksinert rognkjeks, som kan ha vært annerledes ved andre tidspunkt i studiet. På tross av høyere prevalens av atypisk furunkulose hos vaksinert rognkjeks, presterte fisken noe bedre med hensyn til akkumulert dødelighet og prosent daglig tilvekst i sjø. Det er likevel liten grunn til å tro at prevalensforskjell mellom de to gruppene er av betydning, ettersom all rognkjeks i anlegget døde og at det prevalens kan ha vært varierende på merdnivå.

PCR analyser utført med primere spesifikke for A-lagstype V og VI viste at samtlige rognkjeks var infisert med A-lagstype VI. Dette er den vanligste A-lagstypen diagnostisert hos rognkjeks (Gulla, 2015, Bornø et al., 2016). For rognkjeks positiv med *A. salmonicida* i hodenyrevev fem uker etter utsett i sjø, var 20% infisert både med A-lagstype V og VI. En blandingsinfeksjon på 19% er funnet hos berggyllt i et annet anlegg (Øyvind Vågnes, pers.kom.). Dette er en påfallende likhet, og ytterligere arbeid må bekrefte om blandingsinfeksjoner er vanlig, og evt vertstilknyttet.

PCR undersøkelser av bakterieisolat viste at det var vanskelig å isolere rene A-lagstyper fra agarskåler med blandingsinfeksjon. Dette kan mulig knyttes til autoaggregering av bakterier med A-lag (Johnson et al., 1985). A-lagstyping som ikke er basert på typespesifikk PCR vil vanligvis vise type VI da denne vil dominere over type V i kultur på grunn av høyere veksthastighet (Øyvind Vågnes, pers.kom.). Fenotypiske analyser i studiet basert på API 20 NE viste at type V og VI kunne skilles fenotypisk, basert på testene NO₃, GEL og PNP. Det er likevel behov for å teste dette ved et større antall stammer. API 20 E fremviste også differensiering av A-lagstype V og VI med testene VP, GEL og AMY. Disse resultatene er usikre på grunn av et lavt antall isolat.

Genotypisk A-lagstyping differensierer A-lagstyper basert på variasjoner i et enkelt gen, *vapA*-genet. Fullgenomsekvensering av en rekke isolat, viser en lik gruppering som ved genotypisk A-lagstyping (Duncan Colquhoun, pers.kom). Dette underbygger at fenotypiske forskjeller kan differensiere A-lagstyper. Siden *A. salmonicida* er autoaggregerende og

blandingsinfeksjoner kan oppstå, er genotypisk testing ved PCR eller sekvensering en sikrere, men mer omfattende diagnostisk metode.

En MLVA ble anvendt for å undersøke slektskapet mellom *A. salmonicida* isolatene dyrket i studiet. Det ble vist at åtte varianter av A-lagstype VI og én variant av type V forårsaket sykdom hos rognkjeks og leppefisk i studiet. Et individ fremviste to ulike MLVA-profiler. Dette indikerte at variasjonene i VNTR enten oppsto i løpet av bakteriedyrkingen, eller at to ulike varianter av type VI forårsaket sykdom hos et og samme individ. Ved hjelp av et kjent A-lagstype VI isolat ble det vist at VNTR ikke endret seg ved passering gjennom fisk, og deretter flere passasjer på blodskål. Dette indikerte at de observerte VNTR variasjonene hos type VI i studiet sannsynligvis var reelle, og at A-lagstype VI infeksjonen i anlegget hadde bakgrunn i minst åtte forskjellige smittekilder. Vaksinstammen til A-lagstype VI var identisk til den vanligste MLVA-profilen i studiet. Dette indikerte at vaksineisolatet var aktuelt for sykdomsutbruddet på anlegget. Det kan ikke dras konklusjoner rundt sammenhengen mellom MLVA-analyser og vaksinebeskyttelse, ettersom dette ikke er kjent, men det underbygger at vaksineantigenet var tilpasset utbruddet i studiet. Den villfangete leppefisken i anlegget representerte ulike fangstområder i Hordaland og nord-Rogaland. Det var ikke mulig å knytte MLVA-profiler til merder fra ulike fangstområder.

Det var vanskelig å differensiere små forskjeller i VNTR bånd på gelelektroforese. Små avvik i agarosekonsentrasjonen kan ha vært medvirkende til små båndvariasjoner. Ettersom primerne ikke hadde gjenkjennbare markører, kunne ikke båndproduktene på gelen uten videre knyttes til bestemte loki. Dette hadde vært mulig ved bruk av en fluorescerende PCR etterfulgt av kapillærelektroforese (Duodu et al., 2013). Testen inneholdt seks primersett, men kun fem viste produkt på gel. Dette er vist hos en rekke andre isolat testet, og kan indikere at en eller ulike primersekvenser ikke er tilstede hos alle isolat av *A. salmonicida* (Duncan Colquhoun, pers.kom.).

Smitteoverføring med *A. salmonicida* skjer ved fysisk kontakt eller shedding av bakterier i vannet (Cipriano & Bullock, 2001). Det er ukjent hvordan *A. salmonicida* infiserer en vert, men sanntids RT-PCR fra studiet viste at en større andel rognkjeks og leppefisk var positiv for *A. salmonicida* i gjellevev enn hodenyrevev. Dette kan indikere at gjellevev er en potensiell innfallsport for infeksjon, som vist hos salmoniden *Oncorhynchus rhodurus macrostomus* i Japan (Miyazaki & Kubota, 1975). Dette ble underbygget av histologiske

mikrokolonier funnet kun i gjellelev hos nærmere halvparten av individene med mikrokolonier forenelig med *A. salmonicida*.

4.2 DØDELIGHET OG SMITTEPRESS

En korrelerende dødelighetstrend for begge rognkjeksgruppene viste at gruppene responderte tilsynelatende likt etter utsett i sjø. Akkumulert dødelighet på merdnivå varierte fra 23-52%. Merdene med høyest dødelighetsdifferanse var lokalisert med størst avstand fra hverandre i anlegget (merd 1 og 8). Miljøforhold og smittepress kan ha vært årsak til dødelighetsforskjeller på merdnivå. Det er ikke utenkelig at smittepresset og prevalensen av atypisk furunkulose var høyest i ene enden av anlegget. På grunn av et ujevnt og lite antall prøver fra hver merd, var det ikke mulig å knytte prevalens av *A. salmonicida* til merdnivå. Det ble ikke inkludert statistiske analyser for datamaterialet i studiet. Studiets oppsett var ikke egnet for statistisk analysing, ettersom datagrunnlaget på merdnivå var begrenset og varierende, og dødelighetstallene både på merdnivå og gruppenivå var usikre på grunn av 100 % dødelighet i anlegget.

Overgangen fra et stabilt karmiljø til en laksemerd, er betydelig. Rognkjeksene i anlegget fikk ikke akklimatisert seg ved utsett i sjø, men ble sjøsatt i et pågående utbrudd med atypisk furunkulose og suboptimale forhold. Vanntemperaturen ved utsett av rognkjeks var 16°C, og fra felt er det sett en sammenheng mellom forøket dødelighet av rognkjeks og vanntemperaturer >14°C (Dahl, 2017). Utbrudd med atypisk furunkulose opptrer hyppigere i måneder med høy vanntemperatur, og sammenfaller med utbruddet i studiet (Bornø et al., 2016). En temperaturøkning fra 12 til 16°C i et smitteforsøk med en lav-virulent *A. salmonicida* ga høy dødelighet hos rognkjeks (Rønneseth et al., 2017). Dette kan indikere at rognkjeksene har temperaturpreferanser som man ennå ikke kjenner betydningen av. Temperatur påvirker metabolismen og immunologiske responser hos fisk, abiotiske faktorer (feks O₂), og veksthastighet av patogener (Snieszko, 1974), og har trolig vært en viktig påvirkende faktor ved sykdomsutbruddet og dødeligheten i anlegget.

Både vektregistreringer og undersøkelse av mageinnhold indikerte at rognkjeksene tok til seg lite næring etter utsett i sjø. Rognkjeksens prosentvise daglige tilvekst sank fra 3,6% i settefiskanlegget til 0,08% (UV) og 0,16% (V) ved første vektregistrering etter sjøutsett. En

veksttabell utgitt av Skretting forventet en SGR på 1,9% (11°C og 50 gram) (Martin Davidsen, pers. kom.). Havforskningsinstituttet dokumenterte en individvekst hos rognkjeks på 100-600% over to vintermånedene i en forskningsstasjon (Bjelland, 2017). Rognkjeks i feltstudiet vokste med 26 % (V) og 19 % (UV) i løpet av 12 uker i sjø. Ascites og tykt hudlag kan ha kamuflert for avmagring, og tømning av bukvæske i forkant av vektregistrering ville potensielt gitt en enda lavere vekst etter utsett i sjø enn det resultatene viser.

Fra felt er en vanlig observasjon at 70 % av rognkjeks har føde i mage og tarm, og at ca halvparten av disse har lakse- eller rognkjekspellet (Unni Austefjord, pers.kom.). I settefiskanlegg er det observert at sulting over to dager ofte gir væskefylt tarm (Kjartan Wiik, pers.kom.). I dette feltstudiet ble det observert et høyt antall individ med væskefylt tarm etter fem uker i sjø. Redusert appetitt er normalt ved sykdomsutbrudd, men i kontrollerte smitteforsøk med atypisk furunkulose, er det observert at rognkjeks spiser til den dør (Henriette Nordstrand, pers.kom., Gyri T. Haugland, pers.kom.). Dersom dette er overførbart til felt, indikerer det at rognkjeks ville tatt til seg næring, på tross av utbrudd med atypisk furunkulose.

Rognkjeks ble fôret tre ganger per uke, men fôrmengden ble ikke registrert. Fôrproducenten Skretting anbefaler 2-3% daglig utfôring av biomassen de første seks ukene rognkjeks står i sjøen. Dette hadde tilsvart ca 35-40 kg/uke per merd (2%). Rognkjeks fikk trolig et langt lavere antall kilo enn dette. Rognkjeks er beskrevet som en opportunist i matveien, men en høy andel spiser laksepellet om det er tilgjengelig (Imsland et al., 2015). Laksepelleten (10mm) kan i dette studiet ha vært for stor for konsumering. Overflatefôring var en lite egnet fôringsstrategi, ettersom lokaliteten var strømsterk. Sterk strøm påvirket trolig rognkjeksens mulighet for å fange fôr, og rognkjeks ble rapportert å være presset mot notveggen.

Et tidligere feltstudium med oppdrettet berggyllt viste at fôring av rensefisk var mangelfull, og at berggylltens vekt ble kraftig redusert etter utsett i sjø (Fløgum, 2016). Mange fiskehelsetjenester angir fôring å være den største utfordringen etter sjøsetting, og er rangert som nummer to (etter vaksinerings) ved spørsmål om forbedring av overlevelse i sjø (Bornø et al., 2016). Sammen med observasjoner fra dette studiet, indikerer det at fôring er ytterst viktig for dødelighet og velferd av rensefisk.

Etter all sannsynlighet medførte utfordrende miljø- og fôringsforhold etter utsett i sjø at rognkjeks fikk en svekket helsetilstand, som i kombinasjon med et pågående utbrudd av

atypisk furunkulose raskt førte til dødelighet og sykdom hos både vaksinert og uvaksinert rognkjeks.

4.3 EFFEKT AV VAKSINE

Kun 33% av rensesfisken i anlegget var vaksinert, og suboptimale forhold og høyt smittepress kan ha medført at vaksinsens beskyttelsesevne ble oversteget. Det kan derimot ikke utelukkes at immunitet aldri ble oppnådd gjennom vaksinerings. Et kontrollert vaksineforsøk med en tilsvarende vaksine til feltstudiet, ga også høy dødelighet av vaksinert rognkjeks smittet med A-lagstype VI (15°C) (Henriette Nordstrand, pers.kom.). Dette kan antyde at vaksinen ikke stimulerte til en beskyttende immunitet mot A-lagstype VI, eller at forhold som temperatur kan ha påvirket dødeligheten, som mulig indikert i smitteforsøket med den lav-virulente *A. salmonicida* (Rønneseth et al., 2017).

Antigensammensetningen i vaksinen overensstemte med A-lagstyper funnet i studiet og fra andre rapporter (Gulla, 2015, Bornø and Gulla, 2017). A-laget er viktig for stimulering av immunitet mot *A. salmonicida*, og mutasjoner i *vapA* kan gi redusert eller tapt A-lag, feks ved dyrking på høye temperaturer (Ishiguro et al., 1981, Lund et al., 2003, Arnesen et al., 2010, Daher et al., 2011, Gulla et al., 2016). A-lagstype VI er ustabil, og mutasjoner i *vapA*-genet oppsto oftere enn hos andre undersøkte A-lagstyper (Gulla et al., 2016). Ved tap av A-lag i vaksinen ville beskyttelse mot A-lagstype VI trolig være redusert. Det kan ikke utelukkes at titermengden (antigenmengden) i vaksinen var for lav til å indusere en tilstrekkelig immunitet hos rognkjeks mot A-lagstype VI.

Et vaksineforsøk og et feltstudium hos vaksinert berggyllt viste en positiv effekt av vaksinen gjennom lavere dødelighet og prevalens av *A. salmonicida* (Biering et al., 2016, Fløgum, 2016). Dette kan indikere at berggyllt naturlig er mer robust for *A. salmonicida* enn rognkjeks, at vaksinsens batch i studiet hadde et redusert A-lag, at en høyere titermengde er påkrevd for å oppnå immunitet hos rognkjeks, eller at smittepresset og suboptimale forhold i rognkjeksstudiet var høyere enn vaksinen kunne beskytte mot.

Vaksinebivirkninger var synlig hos samtlige vaksinerte rognkjeks, og indikerte at samtlige undersøkte individ var vaksinert og at vaksinen stimulerer til en bukhuleeffekt. Et lavt antall undersøkte individ og manglende erfaring med avlesning av bivirkninger gjør kvaliteten av registreringene usikre. Et transversalsnitt gjennom region 1 ved avlaving, medførte

vanskeligheter med å registrere bivirkningsgrad i denne regionen. Melaninflekker er foreløpig ikke beskrevet fra rognkjeks, og ble heller ikke observert i dette studiet.

4.4 ANDRE FUNN

I tillegg til atypisk furunkulose, ble én rognkjeks påvist med *Pasteurella* sp. Dette antyder at *Pasteurella* sp. i studiet ble overført fra villfanget rognkjeks i sjø, ettersom bakterien aldri har vært diagnostisert fra fisk på settefiskanlegget (Henriette Glosvik, pers.kom.). Denne type *Pasteurella* sp. er heller ikke påvist hos leppefisk eller laks (Johansen et al., 2016, Bornø & Gulla, 2017). Det kan ikke utelukkes at smitteoverføring kan ha skjedd under transport. *V. anguillarum* O1 ble identifisert hos tre rognkjekser, og selv om bakterien opptrer patogent, var samtlige individ positiv for *A. salmonicida* (samtids RT-PCR). Histologiske funn av parasitter hos en rognkjeks ble antatt å være scuticociliater (*Uronema* eller *Miamiensis*), som er kjent for å være åtseletere som angriper dødfisk eller sårisk (Egil Karlsbakk, pers.kom.).

Muskelforandringer ble observert hos rognkjeks med og uten *A. salmonicida* infeksjon. Årsak til disse funnene er ukjent. Utvikling av muskulatur hos rognkjeks er lite kjent, men høyt vanninnhold og lav tetthet i muskulaturen er rapportert hos rognkjekshunnen (Davenport & Kjørsvik, 1986). Utilstrekkelig inntrenging av formalin kan ha medført autolyse, og vevsforandringer som skrumping, kontraksjoner og over- eller underfarging kan ha opptrådt i muskulaturen (Kryvi & Poppe, 2016, s.19). Enkelte observasjoner kan mulig knyttes til dette, men sentralisering av cellekjerner er antatt ikke å skyldes vevsbehandlingen.

Histologisk ble det observert leverforandringer hos individ positive og negative for *A. salmonicida*. Lumpfish Flavivirus infeksjon ble avkreftet ved PCR-diagnostikk. Rognkjeks er fra naturen kjent å spise lavenergimat (maneter og krepsdyr), i motsetning til pellet som inneholder langt mer energi (Sæle, 2017). Leverforandringer med bakgrunn i næringsinntak eller agens kan ikke utelukkes, men krever ytterligere forskning.

4.5 UDOKUMENTERT SVINN

Udokumentert svinn i studiet var betydelig, og utgjorde 68% og 62 % hos henholdsvis vaksinert og uvaksinert rognkjeks i anlegget. Forråtnelse, predasjon og rømming er blant rapporterte årsaker til svinn av rensefisk i laksemerder (Nilsen et al., 2014). Høy temperatur

medfører hurtigere forråtnelse av død fisk, og kan ha vært årsak til udokumentert dødelighet. Strøm kan ha forhindret og forsinket opptak av dødfisk, som har råtnet og ikke blitt registrert. Få individ ble observert med sår forenelig med predatorskade, men det kan ikke utelukkes at udokumentert svinn kan skyldes at laksen i anlegget har spist rognkjeks. Det ble observert én rognkjeks under minstemål for maskestørrelser på 40 mm. Rømming kan derfor utgjøre noe av det udokumenterte svinnet. Det er et alvorlig tegn for næringen at et akvakulturdyr kan opptre med et udokumentert svinn som observert i dette studiet, og viser behovet for økt kunnskap og bedre oppfølging av rognkjeks i sjø.

5 KONKLUSJON

Hovedmålet med studiet var å følge opp en gruppe vaksinert og uvaksinert rognkjeks i felt, og på bakgrunn av dette indikere prestasjon av en vaksine mot *A. salmonicida* A-lagstype V og VI og *V. anguillarum* O1.

- Basert på diagnostiske undersøkelser av *A. salmonicida* presterte ikke den vaksinerte rognkjeksens bedre enn den uvaksinerte. Det kan likevel ikke konkluderes rundt vaksinens effekt. Årsak til dette var at rognkjeksens ble sjøsatt i et pågående utbrudd med atypisk furunkulose under suboptimale forhold som høy vanntemperatur, sterk strøm og lav førtilgang.
- A-lagstype VI var det dominerende smitteagenset i studiet, og MLVA analyser indikerte at minst åtte smitekilder forårsaket sykdom i anlegget. Blandingsinfeksjon med A-lagstype V og VI ble påvist i studiet, og indikerer at A-lagstypene er relevant som vaksineantigen.
- Det ble indikert at A-lagstype V og VI kan bli fenotypisk differensiert ved enkeltstående biokjemiske tester fra API 20 NE (NO₃, GEL og PNPG).
- *Pasteurella* sp. ble diagnostisert fra et individ, og indikerte at smitteoverføring var skjedd fra vill rognkjeks, ettersom bakterien ikke har vært påvist i settefiskanlegget.
- Feltstudiet i sin helhet viser at bruk og hold av rognkjeks i laksemerder er utfordrende, og at det er behov for mer kunnskap om artens biologi, og om røkting i sjø. Basert på

resultat og observasjoner fra studiet kan det indikeres at lokaliteter med sterk strøm kan være uegnet for bruk av rognkjeks, og at utsett av rognkjeks ikke bør skje i perioder med høy vanntemperatur eller pågående sykdomsutbrudd. Ettersom utbrudd med atypisk furunkulose hyppig opptrer hos villfanget leppefisk i laksemerder, kan det vise seg nødvendig å unngå utsett av rognkjeks i anlegg med villfanget leppefisk.

6 FREMTIDSPERSPEKTIVER

- Basert på resultat og observasjoner fra studiet, er det fremdeles et stort behov for kunnskap om bruk og hold av rognkjeks i laksemerder. Kartlegging av rognkjeksens toleranseområder for temperatur og strømforhold i felt er aktuelle forskningsområder. I tillegg kan utarbeiding av fôringsstrategier for lokaliteter med ulik utforming og miljøforhold trolig bedre rognkjeksens liv i laksemerden.
- Det er behov for ytterligere utvikling og uttesting av vaksiner til rognkjeks, og A-lagsstabilitet og titermengde er relevante aspekt for stimulering av immunitet mot *A. salmonicida*.
- Udokumentert dødelighet (svinn) utgjorde over 60% av rognkjeksene i studiet. Dette utgjør et stort område for forskning og forbedring i næringen.

7 LITTERATURLISTE

- ABAYNEH, T., COLQUHOUN, D., AUSTIN, D. & SØRUM, H. 2014. Multilocus variable number tandem repeat analysis of *Edwardsiella piscicida* isolates pathogenic to fish. *Journal of fish diseases*, 37, 941-948.
- ABBOTT, S. L., CHEUNG, W. K. W. & JANDA, J. M. 2003. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2348-2357.
- AKVAKULTURDRIFTSFORSKRIFTEN 2008. Forskrift om drift av akvakulturanlegg.
- ALARCÓN, M., GULLA, S., ROSAEG, M. V., RONNESETH, A., WERGELAND, H., POPPE, T. T., NILSEN, H. & COLQUHOUN, D. J. 2016. Pasteurellosis in lump sucker *Cyclopterus lumpus*, farmed in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 39, 489-495.
- ÁNGELES ESTEBAN, M. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 2012.
- ARNESEN, K. R., MIKKELSEN, H., SCHRØDER, M. B. & LUND, V. 2010. Impact of reattaching various *Aeromonas salmonicida* A-layer proteins on vaccine efficacy in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Vaccine*, 28, 4703-4708.
- AUSTIN, B. & AUSTIN, D. A. 2007. *Bacterial Fish Pathogens - Diseases of Farmed and Wild Fish*, Springer.
- BEAZ-HIDALGO, R. & FIGUERAS, M. J. 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, 36, 371-388.
- BELLAND, R. 1985. Synthesis, export, and assembly of *Aeromonas salmonicida* A-layer analyzed by transposon mutagenesis. *Journal of bacteriology*, 163, 877-881.
- BELLAND, R. 1987. Cloning of the gene for the surface array protein of *Aeromonas salmonicida* and evidence linking loss of expression with genetic deletion. *Journal of bacteriology*, 169, 4086-4091.
- BERG, A., BERGH, Ø., FJELLDAL, P. G., HANSEN, T., JUELL, J.-E. & NERLAND, A. H. 2006. Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk-effekter og bivirkninger. *Fisken og Havet*, 9.
- BIERING, E., VAAGNES, Ø., KROSSØY, B., GULLA, S. & COLQUHOUN, D. 2016. Challenge models for atypical *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* in farmed Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and preliminary testing of a trial vaccine against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 1257-1261.
- BIRKBECK, T., LAIDLER, L., GRANT, A. & COX, D. 2002. *Pasteurella skyensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 699-704.

- BJELLAND, R. Rensefiskens utfordrende liv i ei laksemerd. Rensefiskkonferansen 2017, 2017 Trondheim. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond.
- BJORDAL, Å. 1991. Wrasse as cleaner-fish for farmed salmon. *Prog. Underwater Sci.*, 16, 17-28.
- BORGEN, B. & MUNTHE, L. A. 2007. *Immunologi*, Oslo, Universitetsforlaget.
- BORNØ, G., ALARCÓN, M., LINAKER, M. L., COLQUHOUN, D., NILSEN, H., GU, J., GJERSET, B., HANSEN, H., THOEN, E., GULLA, S. & JENSEN, B. B. 2016. Akutt dødelighet hos rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) i 2015. *Veterinærinstituttets rapportserie*, 2.
- BORNØ, G. & GULLA, S. 2016. Helsen situasjonen hos rensefisk. In: HJELTNES, B., WALDE, C., BANG JENSEN, B. & HAUKAAS, A. (eds.) *Fiskehelserapporten 2015*. Veterinærinstituttet rapportserie.
- BORNØ, G. & GULLA, S. 2017. Helsen situasjonen hos rensefisk. In: HJELTNES, B., BORNØ, G., JANSEN, M. D., HAUKAAS, A. & WALDE, C. S. (eds.) *Fiskehelserapporten 2016*. Veterinærinstituttet 2017.
- BORNØ, G. & LIE LINAKER, M. 2015. Fiskehelserapporten 2014.
- CIPRIANO, R. C. & BERTOLINI, J. 1988. Selection for virulence in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*, using Coomassie brilliant blue agar. *Journal of Wildlife Diseases*, 24, 672-678.
- CIPRIANO, R. C. & BULLOCK, G. L. 2001. *Furunculosis and other diseases caused by Aeromonas salmonicida*, National Fish Health Research Laboratory.
- DAHER, R. K., FILION, G., TAN, S. G., DALLAIRE-DUFRESNE, S., PAQUET, V. E. & CHARETTE, S. J. 2011. Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Veterinary Microbiology*, 152, 353-360.
- DAHL, E. L. Strategisk bruk av rensefisk. Rensefiskkonferansen 2017, 2017 Trondheim. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond.
- DAVENPORT, J. 1985. *Synopsis of biological data on the lumpsucker, Cyclopterus lumpus (Linnaeus, 1758)*, Food & Agriculture Org.
- DAVENPORT, J. & KJØRSVIK, E. 1986. Buoyancy in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66, 159-174.
- DUODU, S., WAN, X., TANDSTAD, N. M., LARSSON, P., MYRTENNÄS, K., SJÖDIN, A., FORSMAN, M. & COLQUHOUN, D. J. 2013. An improved multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) for the fish pathogen *Francisella noatunensis* using capillary electrophoresis. *BMC veterinary research*, 9, 252-261.
- DYREVELFERDSLOVEN 2009. Lov om dyrevelferd
- EGIDIUS, E., WIİK, R., ANDERSEN, K., HOFF, K. & HJELTNES, B. 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, 518-520.
- EURL. 20th Annual Workshop of the National Reference Laboratories for Fish Diseases 2016 Copenhagen. European Union Reference Laboratory for Fish Diseases.
- EVELYN, T. 1971. An Abettant Strain of the Bacterial Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida* Isolated from a Marine Host, the Sablefish (*Anoplopoma fimbria*), and from Two Species of Cultured Pacific Salmon. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 28, 1629-1634.
- FINSTAD, B., BJØRN, P., GRIMNES, A. & HVIDSTEN, N. 2000. Laboratory and field investigations of salmon lice [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] infestation on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture Research*, 31, 795-803.
- FISKERIDIREKTORATET. 2017a. *Sale of farmed cleanerfish 2012-2016* [Online]. Fiskeridirektoratet. Available:

- <http://www.fiskeridir.no/English/Aquaculture/Statistics/Cleanerfish-Lumpfish-and-Wrasse>
[Accessed 31.05. 2017].
- FISKERIDIREKTORATET 2017b. Statistikk for akvakultur 2016 - foreløpige tall. Bergen: Fiskeridirektoratet.
- FISKERIDIREKTORATET. 2017c. *Use of cleanerfish 1998-2016* [Online]. Fiskeridirektoratet. Available: <http://www.fiskeridir.no/English/Aquaculture/Statistics/Cleanerfish-Lumpfish-and-Wrasse> [Accessed 31.05. 2017].
- FLØGUM, V. A. 2016. *Vaksinering av berggyllt (Labrus berggylla) mot Aeromonas salmonicida A-lagstypen V og VI*. Master, UiB Universitetet i Bergen.
- FOLKEHELSEINSTITUTTET. 2016. *Forbruket av lakseluksmidler er fortsatt høyt* [Online]. Folkehelseinstituttet Available: <https://www.fhi.no/hn/legemiddelbruk/fisk/forbruket-av-lakselusmidler-er-fort/> [Accessed 26.09 2016].
- GOULET, D., GREEN, J. M. & SHEARS, T. H. 1986. Courtship, spawning, and parental care behavior of the lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Newfoundland. *Canadian journal of zoology*, 64, 1320-1325.
- GUDDING, R. 2010. *Vaksinering av dyr*, Oslo, Scandinavian Veterinary Press.
- GUDDING, R. 2014. Vaccination as a Preventive Measure *In: GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. (eds.) Fish Vaccination* Wiley-Blackwell.
- GUDDING, R. & GOODRICH, T. 2014. The history of Fish Vaccination. *In: GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. (eds.) Fish Vaccination*. Wiley-Blackwell
- GUDMUNDSOTTIR, B. K. & BJÖRNSDOTTIR, B. 2007. Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine*, 25, 5512-23.
- GULLA, S. 2015. *Introductory studies on bacterial agents infecting cleaner fish*. PhD, Norwegian University of Life Sciences.
- GULLA, S., LUND, V., KRISTOFFERSEN, A., SØRUM, H. & COLQUHOUN, D. 2016. *vapA* (A-layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. *Journal of Fish Diseases*, 39, 329-342.
- GUSTAFSON, C. E., CHU, S. & TRUST, T. J. 1994. Mutagenesis of the paracrystalline surface protein array of *Aeromonas salmonicida* by endogenous insertion elements. *Journal of molecular biology*, 237, 452-463.
- HAUGLAND, G. T., JAKOBSEN, R. A., VESTVIK, N., ULVEN, K., STOKKA, L. & WERGELAND, H. I. 2012. Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry. *PLoS One*, 7, e47909.
- HAUGLAND, G. T., OLSEN, A. B., RØNNESETH, A. & ANDERSEN, L. 2016. Lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) develop amoebic gill disease (AGD) after experimental challenge with *Paramoeba perurans* and can transfer amoebae to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*.
- HEUCH, P. A., BJØRN, P. A., FINSTAD, B., HOLST, J. C., ASPLIN, L. & NILSEN, F. 2005. A review of the Norwegian 'National Action Plan Against Salmon Lice on Salmonids': The effect on wild salmonids. *Aquaculture*, 246, 79-92.
- HEUCH, P. A., OLSEN, R. S., MALKENES, R., REVIE, C. W., GETTINBY, G., BAILLIE, M., LEES, F. & FINSTAD, B. 2009. Temporal and spatial variations in lice numbers on salmon farms in the Hardanger fjord 2004-06. *Journal of Fish Diseases*, 32, 89-100.
- HJELTNES, B., BORNØ, G., JANSEN, M. D., HAUKAAS, A. & WALDE, C. 2017. Fiskehelse rapporten 2016.
- IMSLAND, A. K., REYNOLDS, P., ELIASSEN, G., HANGSTAD, T. A., FOSS, A., VIKINGSTAD, E. & ELVEGÅRD, T. A. 2014. The use of lumpfish (*Cyclopterus*

- lumpus* L.) to control sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestations in intensively farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 424, 18-23.
- IMSLAND, A. K., REYNOLDS, P., ELIASSEN, G., HANGSTAD, T. A., NYTRØ, A. V., FOSS, A., VIKINGSTAD, E. & ELVEGÅRD, T. A. 2015. Feeding preferences of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) maintained in open net-pens with Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 436, 47-51.
- ISHIGURO, E., KAY, W., AINSWORTH, T., CHAMBERLAIN, J., AUSTEN, R. & BUCKLEY, J. 1981. Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *Journal of Bacteriology*, 148, 333-340.
- JOHANSEN, L.-H., COLQUHOUN, D., HANSEN, H., HILDRE, S., WERGELAND, H. I. & MIKALSEN, H. E. 2016. Analyse av sykdomsrelatert risiko forbundet med bruk av villfanget og oppdrettet renseskjete for kontroll av lakselus. *Nofima: Rapport*, 9, 1-46.
- JOHNSEN, B. O. & JENSEN, A. J. 1994. The spread of furunculosis in salmonids in Norwegian rivers. *Journal of Fish Biology*, 45, 47-55.
- JOHNSON, C., TATNER, M. & HORNE, M. 1985. Autoaggregation and extracellular A-layer protein in *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 46, 163-166.
- JOHNSON, S. C. & ALBRIGHT, L. J. 1991. Development, Growth, and Survival of *Lepeophtheirus Salmonis* (Copepoda, Caligidae) under Laboratory Conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71, 425-436.
- JØRGENSEN, J. B. 2014. The Innate Immune Response in Fish In: GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. (eds.) *Fish Vaccination* Wiley-Blackwell.
- KARLSBAKK, E., ALARCÓN, M., HANSEN, H. & NYLUND, A. 2014. Sykdom og parasitter i vill og oppdrettet rognkjeks. *Fisken og Havet, særnummer 1-2014–Havforsknings rapporten*, 37-39.
- KRYVI, H. & POPPE, T. 2016. *Fiskeanatomi*, Bergen, Fagbokforlaget.
- LUND, V., ARNE ARNESEN, J., COUCHERON, D., MODALSLI, K. & SYVERTSEN, C. 2003. The *Aeromonas salmonicida* A-layer protein is an important protective antigen in oil-adjuvanted vaccines. *Fish & Shellfish Immunology*, 15, 367-372.
- LUNDBERG, M. R. 2016. *Immunresponser hos rognkjeks (Cyclopterus lumpus L.) etter administrering av forskjellige oljebaserte injeksjonsvaksiner-Betydning av adjuvant ved intramuskulær og intraperitoneal injeksjon for antistoffrespons og fiskevelferd*. Master UiT The Arctic University of Norway.
- LUSEDATA.NO. 2017. *Bransjeveileder lakselus - Bruk og hold av rognkjeks* [Online]. Available: <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/2014-02-25-Veileder-for-bruk-og-hold-av-Rognkjeks.pdf> [Accessed 23.02 2017].
- MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
- MARCOS-LÓPEZ, M., RUANE, N., SCHOLZ, F., BOLTON-WARBERG, M., MITCHELL, S., MURPHY O'SULLIVAN, S., IRWIN MOORE, A. & RODGER, H. 2017. *Piscirickettsia salmonis* infection in cultured lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Journal of Fish Diseases*.
- MARTIN-CARNAHAN, A. & JOSEPH, S. W. 2005. *Aeromonadales* ord. nov. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer.
- MIYAZAKI, T. & KUBOTA, S. S. 1975. Histopathological Studies on the Furunculosis of Amago—II. *Fish Pathology*, 9, 204-212.
- MUNN, C., ISHIGURO, E. & KAY, W. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infection and Immunity*, 36, 1069-1075.
- MURPHY, K. 2012. *Janeway's Immunobiology*, Garland Science

- MUTOLOKI, S., JØRGENSEN, J. B. & EVENSEN, Ø. 2014. The Adaptive Immune Response in Fish. *In*: GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. (eds.) *Fish Vaccination*. Wiley-Blackwell
- MYHR, E., LARSEN, J., LILLEHAUG, A., GUDDING, R., HEUM, M. & HÅSTEIN, T. 1991. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Applied and environmental microbiology*, 57, 2750-2757.
- MÖLLER, G. 2001. Antigens: Thymus Independent. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons.
- NILSEN, A., VILJUGREIN, H., RØSÆG, M. V. & COLQUHOUN, D. 2014. Rensefiskhelse–kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker. *Veterinærinstituttets rapportserie 12*.
- NODLAND, E. 2017. *Kunne i ekstreme tilfeller telle opp mot 1000 skottelus per fisk* [Online]. iLaks. Available: <http://ilaks.no/kunne-i-ekstreme-tilfeller-telle-opp-mot-1000-skottelus-per-fisk/> [Accessed 19.05 2017].
- NOFIMA. 2015. *Kan være reservoar for IPN virus* [Online]. Available: <https://nofima.no/nyhet/2015/01/rognkjeks-kan-vaere-reservoar-for-ipn-virus/> [Accessed 13.01 2017].
- NORM/NORM-VET 2015. *Usage of antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø / Oslo 2016. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).
- OLSEN, A., MELBY, H., SPEILBERG, L., EVENSEN, Ø. & HÅSTEIN, T. 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of aquatic organisms*, 31, 35-48.
- PATEL, D. M. & BRINCHMANN, M. F. 2017. Skin mucus proteins of lump sucker (*Cyclopterus lumpus*). *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 217-225.
- PETHON, P. & NYSTRÖM, B. O. 1998. *Aschehougs store fiskebok: Norges fisker i farger*, Aschehoug.
- PHARMAQ 2016. *Vaksinemanual til rognkjeks*
- POPPE, T., COLQUHOUN, D., TAKSDAL, T., NILSEN, H. & ALARCÓN, M. 2013. Rognkjeks i oppdrett-diagnostiske og dyrevelferdsmessige utfordringer (Farmed lump sucker-diagnostic and welfare challenges). *Norsk Veterinær Tidsskrift*, 125, 556-558.
- POPPE, T. T. & BERGH, Ø. 1999. *Fiskehelse og fiskesykdommer*, Universitetsforlaget.
- REITH, M. E., SINGH, R. K., CURTIS, B., BOYD, J. M., BOUEVITCH, A., KIMBALL, J., MUNHOLLAND, J., MURPHY, C., SARTY, D., WILLIAMS, J., NASH, J. H., JOHNSON, S. C. & BROWN, L. L. 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*, 9, 427.
- RØNNESETH, A., GHEBRETNISAE, D. B., WERGELAND, H. I. & HAUGLAND, G. T. 2015. Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 52, 132-143.
- RØNNESETH, A., HAUGLAND, G. T., COLQUHOUN, D. J., BRUDAL, E. & WERGELAND, H. I. 2017. Protection and antibody reactivity following vaccination of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) against atypical *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 383-391.
- SALINAS, I. 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology* 4, 525-539.
- SBB. 2016. *Akvakultur, 2015, endelige tall* [Online]. Statistisk sentralbyrå. Available: <https://ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett> [Accessed 23.03 2017].

- SECOMBES, C. & WANG, T. 2012. The innate and adaptive immune system of fish. *Infectious disease in aquaculture: prevention and control*, 231, 3-68.
- SHOEMAKER, C. A. & KLESIUS, P. H. 2014. Replicating Vaccines. *In: GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. (eds.) Fish Vaccination*. Wiley-Blackwell.
- SNIESZKO, S. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6, 197-208.
- SOMMERSET, I., KROSSØY, B., BIERING, E. & FROST, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*, 4, 89-101.
- STEINUM, T., KVELLESTAD, A., RØNNEBERG, L., NILSEN, H., ASHEIM, A., FJELL, K., NYGÅRD, S., OLSEN, A. & DALE, O. 2008. First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *Journal of fish diseases*, 31, 205-214.
- SÆLE, Ø. Hva er fiskens ernæringsbehov. Rensefiskkonferansen 2017, 2017 Trondheim Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond.
- TAFALLA, C., BØRGWALD, J., DALMO, R. A., MWEEMBA MUNANG'ANDU, H. & EVENSEN, Ø. 2014. Adjuvants in Fish Vaccines. *In: GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. (eds.) Fish Vaccination*. Wiley-Blackwell.
- TORRISSEN, O., JONES, S., ASCHE, F., GUTTORMSEN, A., SKILBREI, O. T., NILSEN, F., HORSBERG, T. E. & JACKSON, D. 2013. Salmon lice-impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 36, 171-194.
- VALHEIM, M., HÅSTEIN, T., MYHR, E., SPEILBERG, L. & FERGUSON, H. W. 2000. Varracalbmi: a new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 23, 61-70.
- VAN BELKUM, A. 1999. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Current opinion in microbiology*, 2, 306-311.
- VESTVIK, N. F. Hvordan vaksinerer for best immunitet. Rensefiskkonferansen 2017, 2017 Trondheim
- WIENERROITHER, R., JOHANNESSEN, E., DOLGOV, A., BYRKJEDAL, I., BJELLAND, O., DREVETNYAK, K., ERIKSEN, K., HØINES, Å., LANGHELLE, G. & LANGØY, H. 2011. Atlas of the Barents Sea fishes. *IMR/PINRO Joint Report Series*, 1, 1-272.
- WIKLUND, T. & DALSGAARD, I. 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of aquatic organisms*, 32, 49-69.
- WILSON, K. & WALKER, J. 2005. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 6.ed, Cambridge University Press.
- WONGTAVATCHAI, J., CONRAD, P. A. & HEDRICK, R. P. 1995. Effect of the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* on the immune response of chinook salmon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48, 367-374.
- WOOTTEN, R., SMITH, J. W. & NEEDHAM, E. A. 1982. Aspects of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongates* on farmed salmonids, and their treatment. *Proceedings of Royal Society*, 185-197.
- ZHANG, Y. A., SALINAS, I., LI, J., PARRA, D., BJORK, S., XU, Z., LAPATRA, S. E., BARTHOLOMEW, J. & SUNYER, J. O. 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11, 827-835.

APPENDIKS

APPENDIKS 1: VAKSINEBIVIRKNINGER

Adheranser (sammenvoksinger) Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*)

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

Melanin bukhinne/muskel

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

Figur I: Oversikt over skala brukt for å bestemme vaksinebivirkninger. Modifisert av Eivind Isdalstø (Vaxxinova Norway AS).

Vaksinerester

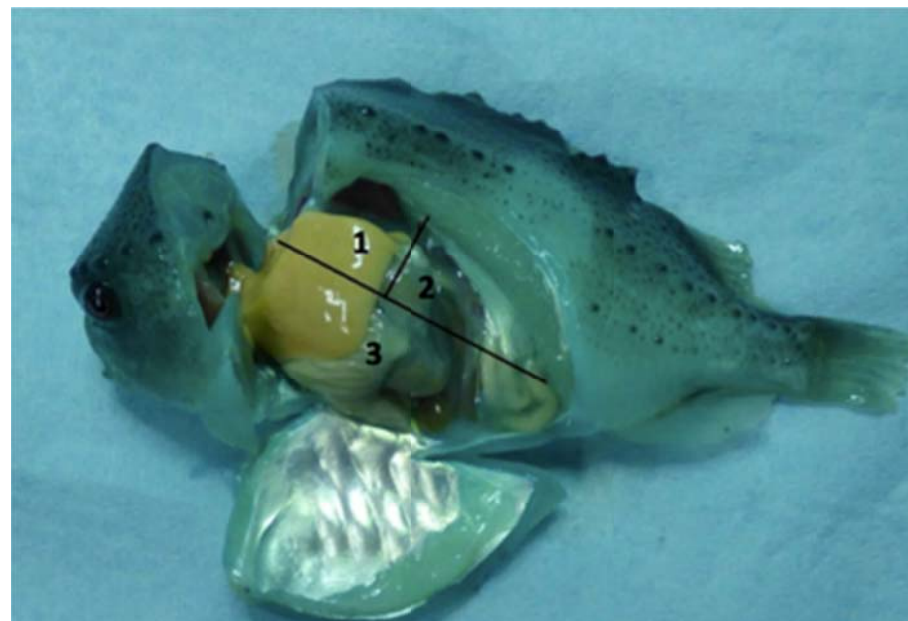
Grad	Beskrivelse
0	Ingen synlige vaksinerester
1	Små mengder vaksinerester innkapslet i depot/dråper og i begrenset antall depot
2	Fritflytende vaksine og eller større depot/dråper på/i organ
3	Større mengder fritflytende vaksine, som når fisken er nyvaksinert

Melanin organ

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

Lokalisering av adheranser

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



APPENDIKS 2: MASTERMIKS

Tabell I: Mastermiks sanntids RT-PCR for *A. salmonicida*

Antall reaksjoner (volum i μ l)	1
RNasefritt vann	3,30
QuantiTect Probe RT-PCR master mix	10,0
QuantiTect RT mix	0,20
<i>A.salm</i> TaqMan Assay Mix 20x	1,00
Elf1a FWD (54 μ M)	0,17
Elf1a REV (54 μ M)	0,17
Elf1a VIC MGB (15 μ M)	0,17

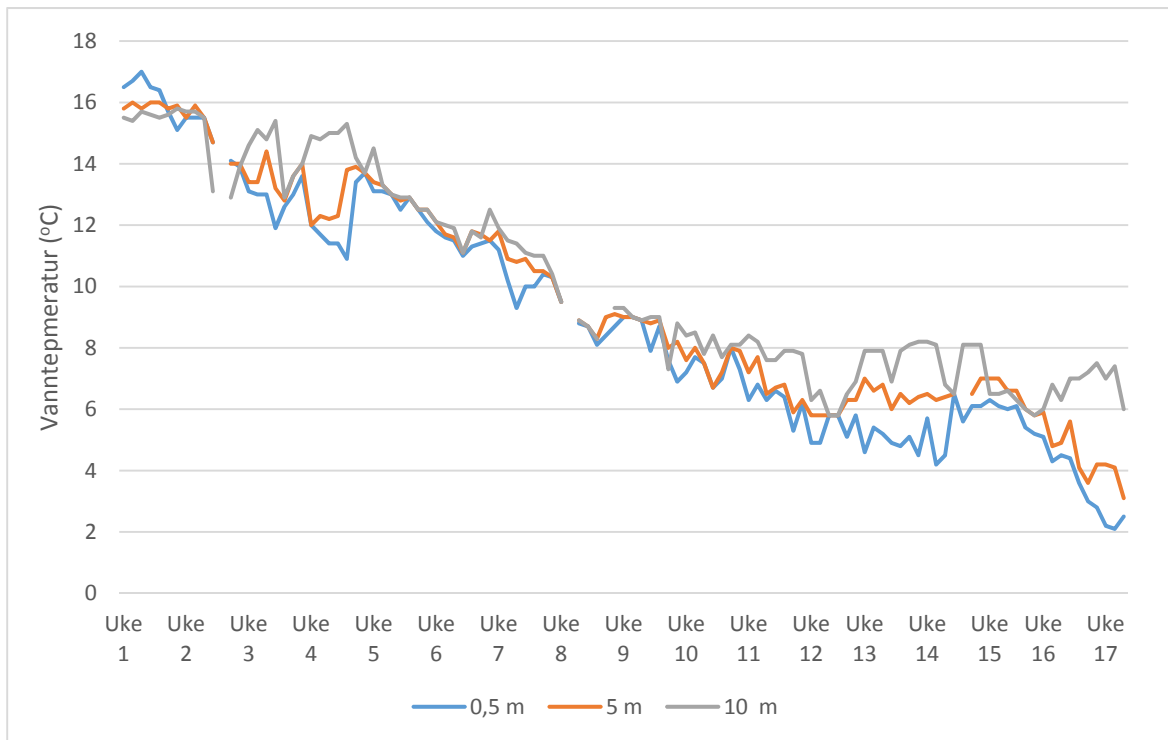
Tabell II: Mastermiks for sanntids RT-PCR for A-lagstype V og VI.

Antall reaksjoner (volum i μ l)	1
RNasefritt vann	4,20
QuantiTect Probe RT-PCR master mix	10,0
QuantiTect RT mix	0,20
Primer FWD (40 μ M)	0,20
Primer REV (40 μ M)	0,20
Probe FAM MGB (20 μ M)	0,20

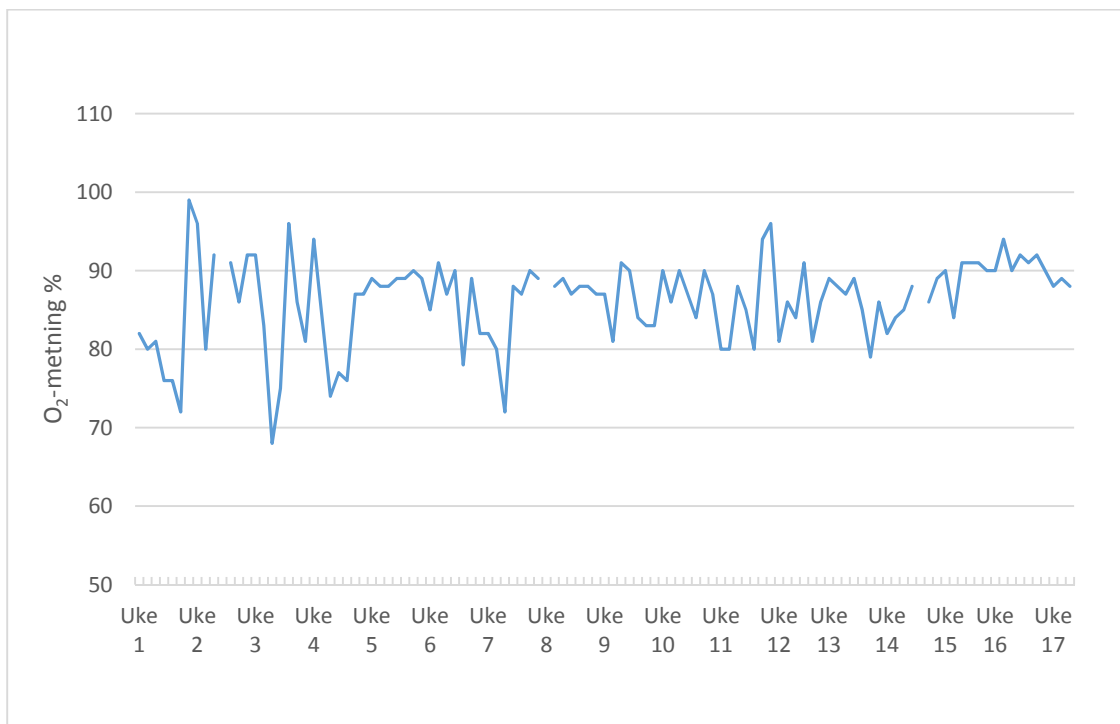
Tabell III: Mastermiks til sekvensering

Antall reaksjoner (volum i μ l)	1
RNasefritt vann	5,25
QuantiTect Probe RT-PCR master mix	12,50
QuantiTect RT mix	0,25
Primer FWD (9 μ M)	1,0
Primer REV (9 μ M)	1,0

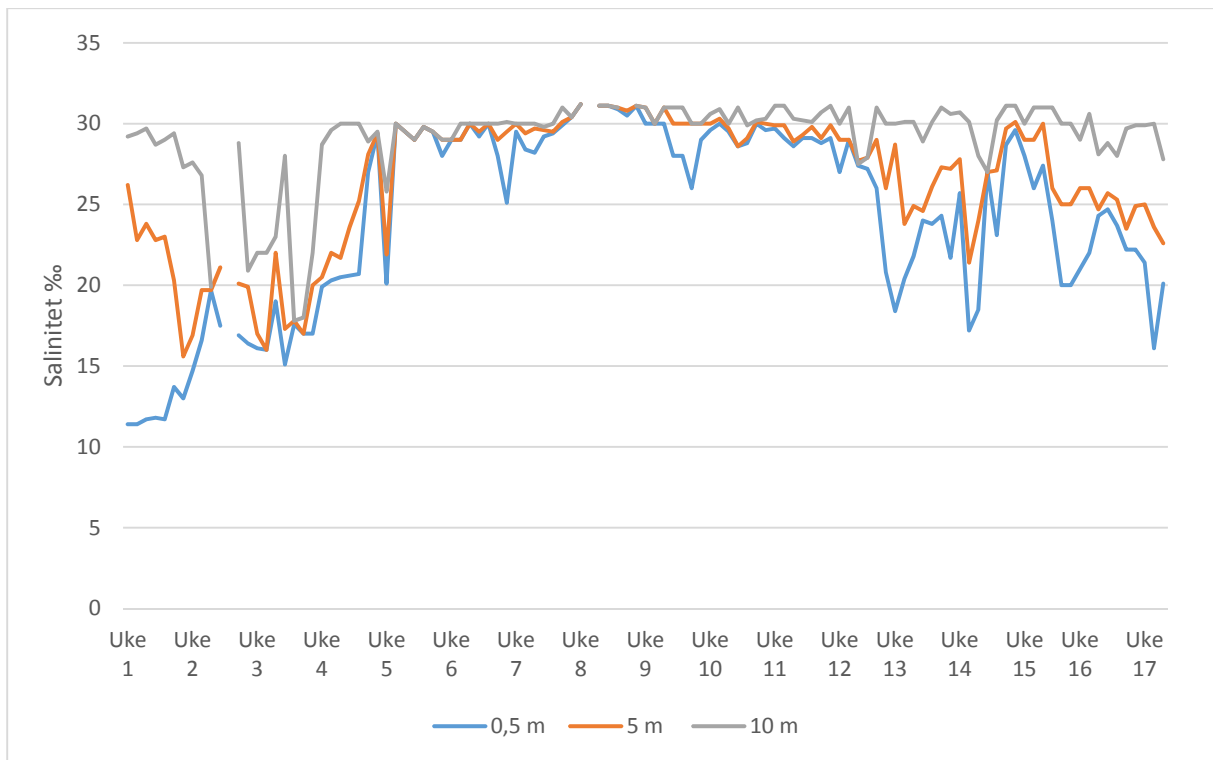
APPENDIKS 3: MILJØMÅLINGER



Figur I. Temperaturmålinger etter utsett i sjø ved 0,5meter, 5 meter og 10 meters dybde



Figur II. O₂-metning på 5 meters dybde etter utsett i sjø.



Figur III. Salinitet % etter utsett i sjø ved 0,5 meter, 5 meter og 10 meters dybde

APPENDIKS 4: VEKT

Tabell I: Vektregistrering oppgitt i gram (g) for uvaksinert rognkjeks gjennom studiet.

Prøveuttak	Prøveuttak 1			Prøveuttak 2			Prøveuttak 3			Prøveuttak 4			Prøveuttak 5		
Dato	10.aug 2016			19.sept 2016			17. okt 2016			7.nov 2016			6.des 2016		
Gruppe	Uvaksinert (g)			Uvaksinert (g)			Uvaksinert (g)			Uvaksinert (g)			Uvaksinert (g)		
	12	17	14	28	38	61	42	50	12	54	46	64			
	10	12	10	68	37	68	72	42	68	34	42	70			
	11	8	8	47	44		60	56	60	44	46	44			
	14	7	7	53	51		52	50	46	38	42	54			
	9	17	12	38	32		60	42	48	72	44	42			
	9	14	12	74	51		46	44	40	60	60	74			
	13	6	10	63	39		32	56	38	48	42	58			
	19	12	11	43	40		80	38	52	40	42	62			
	13	12	8	32	57		58	54		22	42	72			
	11	19	4	46	40		46	58		60	34	46			
	15	8	9	33	46		68	50		80	52	58			
	14	12	7	32	29		46	54		38	54	42			
	11	13	10	26	36		48	42		38	66	76			
	16	11	9	44	35		34	52		54	58	56			
	12	13	13	63	62		42	36		42	50	38			
	12	6	8	49	51		50	54		38	58	56			
	11	9	12	57	47		48	36		68	58	54			
	14	9	9	48	40		44	54		68	56	90			
	6	8	12	44	53		52	34		52		38			
	13	13	12	39	34		34	46		52		50			
	12	15	20	68	54		50	26		54		40			
	10	7	7	79	55		80	26		64		58			
	16	12	6	42	49		48	38		50					
	15	6	13	40	45		46	20		80					
Antall			72			50			56			42			22
Gjennomsnitt			11			47			48			51			56

Tabell II: Vektregistrering oppgitt i gram (g) for vaksinert rognkjeks gjennom studiet.

Prøveuttak	Prøveuttak 1				Prøveuttak 2			Prøveuttak 3			Prøveuttak 4			Prøveuttak 5	
Dato	10.aug 2016				19.sept 2016			17. okt 2016			9.nov 2016			7.des 2016	
Gruppe	Vaksinert (g)				Vaksinert (g)			Vaksinert (g)			Vaksinert (g)			Vaksinert (g)	
	10	10	9	10	60	39	50	46	66	54	50	48	52	68	
	13	11	9	11	40	40	38	48	44	36	56	54	98	52	
	9	11	9		40	54		34	40	42	70	62	64	64	
	11	8	11		50	41		60	44	46	40	40	50	80	
	8	10	9		28	42		50	42		48	38	70	60	
	12	8	12		61	28		54	48		40	22	38	62	
	9	9	11		38	46		46	40		56		62	40	
	7	13	10		45	39		34	32		42		46	50	
	11	10	11		38	52		46	40		44		52	62	
	9	11	8		52	46		52	64		56		20	70	
	10	10	11		27	44		36	72		48		34	48	
	11	8	8		45	48		34	62		50		64	36	
	9	9	11		33	44		34	50		54		76	66	
	11	9	10		34	44		64	58		48		38	54	
	10	11	9		37	44		54	42		38		38	58	
	10	11	12		34	40		46	44		46		22	38	
	13	12	9		47	42		58	42		50		38		
	11	12	10		41	51		32	38		80		44		
	10	10	9		51	46		38	34		54		50		
	9	11	9		46	41		32	32		52		50		
	11	9	10		58	27		28	24		18		64		
	9	7	10		33	38		60	26		60		62		
	12	9	9		43	50		58	52		60		66		
	8	11	8		30	45		44	48		58		44		
Antall				74			50			52			30		40
Gjennomsnitt				10			43			45			49		54

APPENDIKS 5: PRØVEUTTAK I SJØ

Tabell I: Prøveuttak 3, uke fem i sjø. Dato for uttak, art (R= rognkjeks, GG=grønnfylt, BG=bergfylt), gruppe (V=vaksinert, UV=Uvaksinert, L=leppfisk), merdnummer (1,2,3,4,6,7, og 8), tilstedeværelse av *Aeromonas salmonicida* og A-lagstype (V og VI) fra nyre og gjellevev, elongeringsfaktor for rognkjeksvev (LumpElf 1a = Elf1a), fiskens vekt (g) og status (død, frisk, svimer), funn på bakterieskåler (vha fenotypisk typing, A-lagstyping og 16-S rRNA sekvensering) og tilleggskommentar med merknad om histologiuttak for enkeltindivid.

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A. salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
17. okt. 16	K1	RK	UV	1				14,43				15,53	28	F		
17. okt. 16	K2	RK	UV	1	39,76			14,23	32,31		27,66	14,93	20	F		
17. okt. 16	K3	RK	UV	1				14,75	27,31		22,61	14,79	26	F		
17. okt. 16	K4	RK	UV	1	32,69			14,63	37,36			14,94	12	F	<i>Photobacterium</i> sp.	
18. okt. 16	K11	RK	UV	1	32,60			14,88	23,14		18,72	14,56	40	F		
19. okt. 16	K12	RK	UV	1	20,10		16,64	15,51	23,86		19,62	14,88	58	F/S	<i>V. anguillarum</i> O1, <i>Vibrio</i> sp.	Notvegg. To sår på siden. Ascites
19. okt. 16	K13	RK	UV	1	25,34		21,65	15,37	29,10		24,87	15,25	56	F/S	<i>V. anguillarum</i> O1	Notvegg. Stor buk, massiv ascites. Histologi
19. okt. 16	K14	RK	UV	1	19,86		16,32	16,79	15,93		12,36	15,67	54	F/S	<i>A. salmonicida</i> (ikke A-lagstypet)	Notvegg. Ascites. Bendelorm i tarm. Histologi.
19. okt. 16	K15	RK	UV	1	28,58		25,33	14,96	27,33		23,55	14,97	44	F/S		Notvegg. Ascites. Bendelorm i tarm Histologi.
19. okt. 16	K16	RK	UV	1				15,13				14,23	76	F		Noe ascites. Histologi

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A. salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
19. okt. 16	K17	RK	UV	1				14,85	33,28		29,02	15,32	28	F		Tap av hale + sår siden. Histologi.
19. okt. 16	K18	RK	UV	1	28,60		25,30	14,36	33,49		29,35	14,06	68	F		
19. okt. 16	K19	RK	UV	1	16,48		13,08	15,45	27,31		23,11	14,75	38	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
19. okt. 16	K20	RK	UV	1	28,13		24,65	15,86	21,04		16,85	14,59	50	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
17. okt. 16	K5	RK	UV	3	32,12		29,39	14,46	30,79		26,44	14,34	32	F		
17. okt. 16	K6	RK	UV	3	22,66		19,48	16,41	20,68		15,69	16,09	78	S	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
17. okt. 16	K7	RK	UV	3				14,71				15,61	34	F		
17. okt. 16	K8	RK	UV	7				15,54				14,98	54	F		
17. okt. 16	K9	RK	UV	7				14,74				16,06	28	F		
17. okt. 16	K10	RK	UV	7	27,91	27,32	29,68	15,06	25,50	23,89	26,68	14,48	32	F	<i>A. salmonicida</i> (Type V og VI)	
17. okt. 16	V1	RK	V	2	20,79		18,64	15,41	24,99		20,02	15,45	36	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
17. okt. 16	V2	RK	V	2	23,99		22,13	14,59	24,88		20,03	14,06	48	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
19. okt. 16	V16	RK	V	2	24,19		20,91	15,17	24,49		19,69	15,65	65	F/S	<i>Vibrio</i> sp.	Notvegg. Ascites. Histologi
19. okt. 16	V17	RK	V	2				15,29				15,38	42	S		Notvegg. Sår. Ascites. Histologi
19. okt. 16	V18	RK	V	2				15,14	31,47		26,63	15,25	50	F/S		Notvegg. Utstående øye
19. okt. 16	V19	RK	V	2	19,94		17,12	15,09	22,97		18,49	14,47	24	F/S	<i>A. salmonicida</i> (Type VI) <i>Pasteurella</i> sp.	Notegg
19. okt. 16	V20	RK	V	2	14,76		12,12	17,49	16,96	30,76	11,66	13,89	58	F/S		Notvegg. Ascites
17. okt. 16	V3	RK	V	4	39,43			14,30				15,72	24	F		
17. okt. 16	V4	RK	V	4				14,92	tom			29,92	22	F		Gjelle til PCR ikke tatt ut.

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A. salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
19. okt. 16	V14	RK	V	4	23,80	22,73	28,62	15,42	23,52	22,62	29,16	15,59	28	F/S	<i>Vibrio</i> sp. Antatt <i>A. salmonicida</i>	Notvegg
19. okt. 16	V15	RK	V	4	37,65			15,38				15,41	44	F/S		Notvegg. Histologi
17. okt. 16	V5	RK	V	6	25,37	25,30	25,00	14,70	23,17	24,06	18,96	14,80	40	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
17. okt. 16	V6	RK	V	6				14,44				16,27	32	F	<i>Vibrio</i> sp.	
17. okt. 16	V7	RK	V	6	29,18	29,87	28,35	14,62	32,65	32,68	32,28	15,83	38	F		
19. okt. 16	V12	RK	V	6	20,65		17,06	14,88	26,86		22,54	14,87	42	F/S	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	Notvegg
19. okt. 16	V13	RK	V	6	30,31		27,17	15,58	28,89		24,27	14,40	50	F/S	<i>Vibrio</i> sp.	Notvegg. Ascites. Histologi
17. okt. 16	V8	RK	V	8				14,35				17,82	32	F		
17. okt. 16	V9	RK	V	8	35,84		31,15	14,53	33,84		29,09	17,41	24	F		
19. okt. 16	V10	RK	V	8	15,35	21,88	11,95	15,01	16,52	18,81	12,75	14,56	48	F/S	<i>A. salmonicida</i> (Type V og VI) <i>Vibrio</i> sp.	Notvegg
19. okt. 16	V11	RK	V	8	32,13		28,58	15,02	37,10			14,61	62	F/S	<i>V. anguillarum</i> O1	Notvegg. Ascites. Histologi
18. okt. 16	L1	GG	L	1	19,13		16,88	30,52	18,21		14,23	30,60	44	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
18. okt. 16	L2	GG	L	1	25,34		23,22	30,58	23,29		19,02	30,68	50	F	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	Sår ryggfinne
18. okt. 16	L3	GG	L	1	31,56		28,66	30,82	30,88		26,75	30,84	40	F		
18. okt. 16	L4	GG	L	1				30,56	31,68		28,06	27,83	60	F		
18. okt. 16	L5	GG	L	1				31,33	33,44		28,88	30,36	48	F		
18. okt. 16	L6	GG	L	1				32,44	34,87		29,53	30,53	48	F		
18. okt. 16	L7	GG	L	1				31,33	35,32		30,03	30,31	58	F		Histologi
18. okt. 16	L8	GG	L	1				30,80	33,48		28,75	30,17	54	F		Histologi
18. okt. 16	L9	BG	L	1				31,59				31,31	82	F		
18. okt. 16	L10	BG	L	6				32,21				30,45	106	F		
18. okt. 16	L11	BG	L	6				31,53				31,05	118	F		

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	<i>A. salm</i> nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	<i>A. salm</i> gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
18. okt. 16	L12	BG	L	6				32,45				31,76	54	F		
18. okt. 16	L13	BG	L	6				32,29				31,14	122	F		
18. okt. 16	L14	BG	L	6				33,24				27,10	100	F		
18. okt. 16	L15	BG	L	6				32,67				31,56	70	F		
18. okt. 16	L16	GG	L	6				31,65				30,15	64	S		
18. okt. 16	L17	BB	L	6				32,75				31,97	100	F		
18. okt. 16	L18	GG	L	6				32,33				30,76	92	F		Sår halerot
18. okt. 16	L19	GG	L	6				32,05				30,64	36	F		
18. okt. 16	L20	GG	L	6	29,02		25,85	33,72	21,87		17,82	31,76	52	F	<i>A. salmonicida</i> Type VI	

Tabell II. Prøveuttak 4, uke åtte i sjø. Tabellen viser dato for uttak, art (R= rognkjeks, GG=grønngylt, BG=berggylt), gruppe (V=vaksinert, K=kontroll, L=leppefisk) og merdnummer, tilstedeværelse av *Aeromonas salmonicida* og A-lagstype (V og VI) fra nyre og gjellevev, elongeringsfaktor for rognkjeksvev (LumpElf 1a = Elf1a), fiskens vekt (g) og status (død, frisk, svimer), fôr i mage/tarm (0-3) funn på bakterieskål (vha fenotypisk typing, A-lagstyping og 16-S sekvensering) og tilleggskommentar med merknad om histologiuttak for enkeltindivid.

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A.salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død (D), frisk (F), svimer (S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
7.nov 16	K21	RK	UV	1									54	F	0 (væske)		Histologi
7.nov 16	K22	RK	UV	1									34	F	2 (groe)		Histologi
7.nov 16	K23	RK	UV	1					37,21				44	F	1 (groe)		
7.nov 16	K24	RK	UV	1									38	F	2 (groe)		Utstående h.øyet
7.nov 16	K25	RK	UV	1	37,26								72	F	2 (groe)		
7.nov 16	K26	RK	UV	1	18,29		17,45		33,36		25,27		60	F	2 (groe)	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
7.nov 16	K27	RK	UV	1									48	F	0 (væske)		
7.nov 16	K28	RK	UV	1									40	F	1 (groe)		
7.nov 16	K29	RK	UV	1									22	F	0 (væske)		
7.nov 16	K30	RK	UV	3	39,21								38	F	0 (væske)		Histologi
7.nov 16	K31	RK	UV	3	39,07								38	F	0 (væske)		
7.nov 16	K32	RK	UV	3	29,62		28,34		22,49		19,85		54	F	0 (væske)		Histologi
7.nov 16	K33	RK	UV	3	32,69		31,61		28,91		26,66		42	F	0 (væske)		
7.nov 16	K34	RK	UV	3	39,85								38	F	2 (groe)		
7.nov 16	K35	RK	UV	7	35,75		33,75		33,61		30,36		60	S	1 (groe)		Histologi
7.nov 16	K36	RK	UV	7					31,81		28,65		42	F	2 (groe)		
7.nov 16	K37	RK	UV	7									42	F	1 (groe)		
7.nov 16	K38	RK	UV	7	35,37		36,05		33,98		31,83		42	F	0 (væske)		Ujevn farge nyre
7.nov 16	K39	RK	UV	7	34,92		33,81		37,74				34	F	1 (groe)		Stor tarm
7.nov 16	K40	RK	UV	7					36,06				52	F	2 (groe)		
9.nov 16	V21	RK	V	8	16,45		14,65		17,94		14,67		48	D	2 (groe)	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	Katarakt

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merdd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
9.nov 16	V22	RK	V	8	35,19		34,99						50	F	0 (væske)		Store nyrer. Histologi
9.nov 16	V23	RK	V	8	38,83				32,62		29,02		54	F	1 (fôr)		
9.nov 16	V24	RK	V	8	23,65		22,56		18,23		15,93		48	F	1 (fôr)	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
9.nov 16	V25	RK	V	8	37,27								38	F	0 (væske)		
9.nov 16	V37	RK	V	8									46	F/S	1 (groe)		
9.nov 16	V26	RK	V	6	35,68		34,10						50	F	2 (groe)		
9.nov 16	V27	RK	V	6	14,98		13,31		19,11		15,57		54	F/S	0 (væske)	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	Histologi. Stor buk.
9.nov 16	V28	RK	V	6	36,00		33,85		37,80				52	F	1 (groe)		
9.nov 16	V29	RK	V	6	33,93		32,60		32,01		28,50		18	F	1 (groe)		
9.nov 16	V30	RK	V	6	36,89		35,04		35,10		31,32		60	F	0 (væske)		
9.nov 16	V31	RK	V	6					38,31				60	F/S	1 (groe)		Histologi
9.nov 16	V32	RK	V	6	38,20				36,52		33,16		58	F	2 (groe+ bendelor m)		
9.nov 16	V33	RK	V	6	33,00		30,81		36,13		33,04		48	F	3 (groe+ fôr)		
9.nov 16	V34	RK	V	6									54	F/S	1 (groe)		Lå på gangfeltet
7.nov 16	V40	RK	V	6	22,44		21,23		34,62		26,49		102	F	--	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	
9.nov 16	V35	RK	V	2					37,29				22	F	0 (væske)		
9.nov 16	V36	RK	V	2	38,14								38	F	0 (væske)		Histologi
9.nov 16	V38	RK	V	4	30,30		28,08		28,98		25,06		40	F	1 (groe)		Histologi
9.nov 16	V39	RK	V	4									62	F	2 (groe)		Krøll på tarm.
8.nov 16	L21	GG	L	1					31,18		29,03		62	F	0		
8.nov 16	L22	GG	L	1	21,53		20,79		24,90	31,11	22,16		46	F	0	<i>A. salmonicida</i> (Type VI)	Histologi. Sår ryggfinne
8.nov 16	L23	GG	L	1									44	F	0		

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elfla nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elfla gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
8.nov 16	L24	GG	L	1					36,48		34,55		70	F	0		Mye bendelorm
8.nov 16	L25	GG	L	1									48	F	0		Mye bendelorm
8.nov 16	L26	GG	L	1					34,91		32,41		90	F	0		
8.nov 16	L27	GG	L	6	34,98		34,53						60	F	0		
8.nov 16	L28	BG	L	6									82	F	0		
8.nov 16	L29	BG	L	6									60	F	0		
8.nov 16	L30	BG	L	6									78	F	2(fôr)		Bendelorm
8.nov 16	L31	GG	L	6					36,04		32,13		62	F	0		
8.nov 16	L32	GG	L	6									36	F	0		
8.nov 16	L33	GG	L	6									40	F	0		
8.nov 16	L34	BG	L	6					37,87				88	F	0		
8.nov 16	L35	BG	L	6									154	F	3 (groe + skjell)		Bendelorm
8.nov 16	L36	GG	L	6	35,88		33,90		36,17		32,97		78	F	0		Granulom nyrer. Bendelorm Histologi.
8.nov 16	L37	BG	L	6									50	F	3 (fôr)		
8.nov 16	L38	BG	L	6									136	F	3 (fôr)		Bendelorm
8.nov 16	L39	GG	L	6					39,87				76	F	1 (skjell)	<i>Carnibacterium</i> sp.	Bendelorm
8.nov 16	L40	BG	L	6	39,19				34,74		31,61		174	F	3 (fôr + fiske-skjell)		

Tabell III. Prøveuttak 5, 12 uke i sjø. Tabellen viser dato for uttak, art (R= rognkjeks, GG=grønnlylt, BG=berglylt), gruppe (V=vaksinert, K=kontroll, L=leppfisk) og merdnummer, tilstedeværelse av *Aeromonas salmonicida* og A-lagstype (V og VI) fra nyre og gjellevev, elongeringsfaktor for rognkjeksvev (LumpElf 1a = Elf1a), fiskens vekt (g) og status (død, frisk, svimer), fôr i mage/tarm (0-3) funn på bakterieskål (vha fenotypisk typing, A-lagstyping og 16-S sekvensering) og tilleggskommentar med merknad om histologiuttak for enkeltindivid.

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A.salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død (D), frisk (F), svimer (S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
6. des 16	K49	RK	UV	1	35,99		33,18	13,02	32,40		30,16	15,10	64	F/S	3 (reke?)		Litt blek kroppsfarge. Histologi
6. des 16	K50	RK	UV	1				13,30				15,60	70	F	2 (groe + reke?)		
6. des 16	K51	RK	UV	1				13,42				14,26	44	F	1 (væske + groe)		V.øye blødning + katarakt
6. des 16	K52	RK	UV	1				13,49				14,63	54	F/S	1 (groe)		Bleke gjeller.
6. des 16	K45	RK	UV	3				13,47	37,10			14,43	42	F	2 (fôr + reke?)		
6. des 16	K46	RK	UV	3				14,41	35,95		32,48	13,85	72	F	3 (groe + reke?)		Bleke gjeller.
6. des 16	K47	RK	UV	3				13,88				14,62	58	F	2 (groe)		Sår over øyne og langs siden. Stor milt, og bleke nyrer. Histologi
6. des 16	K48	RK	UV	3				12,46				14,76	62	F	1 (groe + reke?)		Sår på siden
6. des 16	K53	RK	UV	3				13,51				14,31	72	F	1 (reke?)		
6. des 16	K54	RK	UV	3				13,03				14,58	46	F	2 (groe + reke?)		Utspilt buk. Fargeend. øyne. Blødning i nyre.
6. des 16	K55	RK	UV	3				13,44				14,66	58	F	0 (væske)		Katarakt
6. des 16	K56	RK	UV	3				13,50	36,10		34,14	15,36	42	F	2 (reke?)		Katarakt (-). Blødning musk.

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
6. des 16	K57	RK	UV	3				13,52	35,44		34,27	16,09	76	F	2 (manter? + reke?)		
6. des 16	K58	RK	UV	3				13,13			31,52	13,93	56	F	1 (reke?)		
6. des 16	K59	RK	UV	3				12,85				14,10	38	F	1 (reke?)		Blødning lever.
6. des 16	K60	RK	UV	3				14,04	33,16		31,33	15,25	56	F	3 (reke?)		
6. des 16	K41	RK	UV	7				15,31				14,82	38	F	0 (litt væske)		
6. des 16	K42	RK	UV	7				12,87	36,92		35,59	14,01	50	F	1 (reke?)		Småsar på ryggen
6. des 16	K43	RK	UV	7	32,48		30,42	13,83	35,35		32,28	14,01	40	F	0 (litt væske)		Katarakt. Bleke nyrer. Histologi
6. des 16	K44	RK	UV	7				13,68				15,16	58	F	0 (litt væske)		Blek lever.
7. des 16	V43	RK	V	2	36,50		30,42	13,97	34,35		32,86	15,80	62	F	1 (groe + reke?)		
7. des 16	V44	RK	V	2	38,17			13,63	38,88			15,75	46	F	0 (væske/ gelé)		Katarak
7. des 16	V45	RK	V	2				13,82	37,92			16,16	52	F	2 (fôr + reke?)		Katarak
7. des 16	V46	RK	V	2				16,63	34,05		32,86	15,64	20	F	1 (væske + noe hvitt)		Katarak. Blek lever
7. des 16	V47	RK	V	2				14,16	33,72		32,98	14,85	34	F	2 (groe + reke?)		
7. des 16	V48	RK	V	2				15,28	32,60		30,58	14,85	64	F	1 (groe + reke?)		
7. des 16	V49	RK	V	2				13,53	33,62		32,38	14,47	76	F	3(bendelorm)		Mye bendelorm
7. des 16	V50	RK	V	2				14,38	37,31			16,79	38	F	3 (fôr)		Histologi

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
7. des 16	V42	RK	V	4	20,34		17,40	13,52	20,52		19,99	15,17	38	F/S	1 (groe/fôr/væske)	A.salmonicida (Type VI)	Stor milt. Bleke gjeller. Avmagret. Katarakt. Mulig granulom nyre. Histologi.
7. des 16	V52	RK	V	4				13,06				15,62	22	F	1 (væske + groe)		Bleke gjeller + lever
7. des 16	V53	RK	V	4				14,05	36,03			17,17	38	F	1 (reke?)		Katarakt
7. des 16	V54	RK	V	4				14,41	34,40		33,52	15,22	44	F	2 (manter? og reke?)		
7. des 16	V41	RK	V	6				13,30	25,05		23,73	15,22	70	F/S	0 (væske)		Litt blek (farge). Histologi
7. des 16	V58	RK	V	6				13,72	37,99			16,22	8	F	1 (reke?)		
7. des 16	V59	RK	V	6				14,33	37,76			16,92	36	F	1 (reke?)		
7. des 16	V60	RK	V	6				14,52				17,12	-	F	0 (gelé)		Katarakt
7. des 16	V51	RK	V	8				14,08				14,20	66	F/S	2 (væske + reke?)		
7. des 16	V55	RK	V	8				14,43	36,34		36,95	16,07	54	F	1 (groe)		Katarakt
7. des 16	V56	RK	V	8				14,84	35,83		37,38	16,14	58	F	1 (groe + fôr)		Katarakt
7. des 16	V57	RK	V	8				14,91				17,00	38	F	1 (reke?)		
8. des 16	L47	BG	L	2				32,33	35,49		33,80	32,32	183	F	0		
8. des 16	L48	GG	L	2				32,35	27,77		25,94	29,54	100	F	0		
8. des 16	L49	BG	L	2				33,30				31,94	52	F	0		
8. des 16	L50	GG	L	2				33,67	36,62		35,33	31,02	62	F	0		"sprikende lever"
8. des 16	L51	BG	L	2				32,75				31,71	78	F	0		
8. des 16	L52	GG	L	2				32,57	28,41	30,07	28,56	30,32	54	F	0		Blødning finnebasis (bryst). "sprikende lever"

Dato	Fisk nr	Art	Gr	Merd	A.salm nyre	Type V	Type VI	Elf1a nyre	A. salm gjelle	Type V	Type VI	Elf1a gjelle	Vekt (g)	Død(D), frisk(F), svimer(S)	Fôr mage /tarm (0,1,2,3)	Bakterieskål (BA/BAS)	Kommentar
8. des 16	L53	BG	L	3				33,02				31,52	72	F	1 (groe + fôr)		
8. des 16	L45	GG	L	4	25,15	25,74		30,26	21,77	22,72	32,96	27,99	94	F	2 (fôr)	A.salmonicida (Type V)	
8. des 16	L46	GG	L	4				32,36	34,24		32,15	31,31	46	F	0		Granulom nyre? Histologi.
7. des 16	L41	BG	L	6				32,06	33,06		31,65	30,81	82	S	0		Stor sår på rygg og hale. Histologi.
8. des 16	L54	GG	L	6				32,99	33,55		30,93	31,14	50	F/S	0		Bendelorm.
8. des 16	L55	BG	L	7				34,38	36,92			30,89	114	F	2 (fôr)		
7. des 16	L42	GG	L	8				33,24				31,33	92	F	0		
7. des 16	L43	BG	L	8				32,78				26,97	78	F	0		
7. des 16	L44	GG	L	8				33,77	33,43		31,69	31,28	100	F	0		

APPENDIKS 6: DØDELIGHET

Tabell I. Akkumulert dødelighet (%) på merdnivå fra utsett til prosjektets avslutning. UV = uvaksinert rognkjeks, V = vaksinert rognkjeks.

Akkumulert Dødelighet (%)	Merd 1 (UV)	Merd 2 (V)	Merd 3 (UV)	Merd 4 (V)	Merd 6 (V)	Merd 7 (UV)	Merd 8 (V)
Uke 1	0	0	0	0	0	0	0
Uke 2	1,7	2,5	1,4	1,0	1,6	1,0	1,0
Uke 3	7,0	6,5	3,4	3,6	4,5	2,1	2,2
Uke 4	17,9	11,7	6,1	6,3	6,7	4,0	4,0
Uke 5	35,7	29,2	23,0	19,3	26,2	18,6	14,4
Uke 6	45,3	35,3	28,4	23,9	28,2	22,1	17,0
Uke 7	46,5	36,2	28,9	25,0	29,1	22,9	18,0
Uke 8	46,9	36,5	29,6	25,9	30,0	23,7	18,6
Uke 9	49,3	39,3	31,2	27,3	31,7	25,8	20,4
Uke 10	49,7	39,9	31,5	27,5	32,3	26,3	21,2
Uke 11	50,5	40,9	31,9	28,3	33,1	27,2	22,0
Uke 12	51,5	41,4	33,2	29,1	33,5	27,6	22,6
Uke 13	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Uke 14	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Uke 15	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Uke 16	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Uke 17	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Uke 18	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Sum (%)	51,8	41,8	33,4	29,4	33,6	27,9	23,0
Svinn (%)	48,2	58,2	66,6	70,6	66,4	72,1	77,0

APPENDIKS 7: API 20 NE OG API 20 E

Tabell I. Resultat fra API 20 NE og API 20 E basert på isolat fra studiet. Differensierende resultat fra A-lagstype V og VI er inkludert i tabellen. API 20 E var kun representert med to isolat.

Prøveuttak	Isolat	Opprinnelse	A-lags type	Oksy-dase	API 20 NE					API 20 E			
					NO ₂	N ₂	GLU	GEL	PNPG	VP	GEL	AMY	SOR
Prøveuttak 1 (okt. 17)	V1	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V2	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V5	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V10	<i>C. lumpus</i>	V	+	-	-	-	-	+				
	V12	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V13	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V19	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V20	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	K6	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	K10	<i>C. lumpus</i>	V	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+/-*
	K19	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	K20	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	L1	<i>S. melops</i>	VI	+	+		-	+	-				
	L2	<i>S. melops</i>	VI	+	+		-	+	-				
L20	<i>S. melops</i>	VI	+	+		-	+	-					
Prøveuttak 2 (nov. 17)	V21	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-	+	+	-	-
	V24	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V27	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	V40	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	K26	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	L22	<i>S. melops</i>	VI	+	+		-	+	-				
Prøveuttak 3 (des. 16)	V42	<i>C. lumpus</i>	VI	+	+		-	+	-				
	L45	<i>S. melops</i>	V	+	-	-	+	-	+				

*SOR ble svakt positiv etter 48 timer, men gikk tilbake til negativ etter 3-4 døgn.