Testing av vaksinasjonsregimer for rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, mot *Aeromonas salmonicida*

Henriette Nordstrand

Master i Fiskehelse
Universitetet i Bergen
1. juni 2017

Forord

Arbeidet presentert i denne mastergradsoppgaven er utført ved Universitetet i Bergen (UiB) ved Institutt for biologi, og er en del av profesjonsstudiet i fiskehelse. Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF), Vaxxinova Norway og Marine Harvest. Forsøk og laboratoriearbeid har blitt utført ved Stiftelsen Industrilaboratoriet (ILAB) og Vaxxinova Norway.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til mine veiledere Duncan J. Colquhoun og Bjørn Krossøy. Duncan, tusen takk for konstruktive tilbakemeldinger, tålmodighet og gode råd. Tusen takk Bjørn for du alltid har vært tilgjengelig, jeg setter stor pris på dine tilbakemeldinger og alle tirsdagsmøtene vi har hatt dette året.

Jeg ønsker å takke alle ved Vaxxinova Norway, dere er en enestående gjeng med mye god humor! Jeg ønsker spesielt å takke Øyvind Brune Vågnes, Victoria Alice Fløgum og Torill Vik Johannesen som alle har bidratt mye til dette prosjektet.

Jeg vil også rette en takk til gjengen ved ILAB, som har sørget for fisken og stilt opp på kort varsel.

I tillegg vil jeg takke mine klassekamerater som har gjort disse fem studieårene helt fantastisk, jeg kommer til å savne dere alle. Helene Sæbjørnsen, tusen takk for gode samtaler, omsorg og glede.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære familie. Jørn Tage, tusen takk for din evige tålmodighet gjennom disse årene. Og helt til slutt, mine to solstråler Ada Marie og Henrik, jeg elsker dere.

Bergen, 29. mai 2017
Henriette Nordstrand

Sammendrag

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er i dag den største helserelaterte utfordringen innen oppdrett av laksefisk i Norge. Fremveksten av lakselus med nedsatt følsomhet for flere ulike kjemikalier, multiresistente lakselus, er svært problematisk. Som en konsekvens av dette har det blitt et behov for ikke-medikamentelle behandlingsformer mot lakselus, og forbruket av rensefisk som avlusningsmetode har de senere årene hatt en sterk økning.

Det er i dag en oppfatning om at overlevelse er generelt lav hos rensefisk etter utsett i sjø, og i 2013 ble det registrert en dødelighet opptil 48 prosent hos rognkjeks. Den høye dødeligheten er trolig knyttet til flere årsaker, men de mest alvorlige dødelighetsepisodene etter utsett er forbundet med bakterielle infeksjoner. Fiskehelserapporten fra 2016 beskriver infeksjoner med *A. salmonicida* som en av de viktigste bakterielle sykdommene hos rensefisk.

Målet med dette forsøket var å teste ulike vaksineregimer for rognkjeks mot *A. salmonicida* subtype VI. Fra tidligere forsøk ved Universitetet i Tromsø vet man at rognkjeks har en økende immunrespons frem til 600 døgngrader etter stikkevaksinering. Dette er i praksis en lang tilbakeholdelsestid som er vanskelig å gjennomføre på grunn av rask vekst hos rognkjeks. Det finnes imidlertid ingen kunnskap om når den beskyttende immuniteten er oppnådd. Målsetning med dette prosjektet har vært å undersøke hvor lang tid det tar mellom vaksinering til det er oppnådd beskyttelse mot *A. salmonicida* i rognkjeks. Vaksinebeskyttelse ble testet etter 300, 450 eller 780 døgngrader. I tillegg har det blitt undersøkt om det er mulig å få en raskere beskyttelse ved bruk av ulike kombinasjoner av dypp- og stikkvaksinering.

I dette studiet ble det ikke observert noe forskjeller mellom vaksinerte og uvaksinerte grupper med hensyn til beskyttelse i forsøk med kohabitantsmitte. Det tok 20-25 dager etter smitte før det var registrert dødelighet i samtlige grupper, og den opptrådde akutt (over 70%). I i.p. smitteforsøk var det en signifikant målbar grad av beskyttelse i stikkvaksinerte grupper, i form av forsinket dødelighet, i smitteforsøk 300 og 450. Overordnet konklusjon fra dette studiet er at vaksinen mot *A. salmonicida* subtype VI ikke har gitt en tilfredsstillende beskyttelse mot *A. salmonicida*, og man vet per dags dato ikke hva som er årsaken. Sannsynligvis kan det være flere mulige faktorer, som sammensetning av vaksine, smittepress og helsestatus til forsøksfisk.

Abstract

The salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) is currently the most serious problem in Norwegian salmon aquaculture. The increase in prevalence of salmon lice with reduced sensitivity to several different chemicals i.e. multi-resistant, is very problematic. As a consequence of this there has been a demand for alternative treatments against salmon lice, and the number of cleaner fish used has increased greatly in recent year.

Today it is clear that survival is generally poor in cage stocked cleaner fish and in 2013 mortality rates of up to 48 percent were observed in lumpfish. The high mortality is probably linked to several causes, but the most serious episodes are associated with bacterial infections. The fish health report from 2016 describes infection with *A. salmonicida* to be one of the most important.

The aim of the current study was to test different vaccine regimens against *A. salmonicida* subtype VI infection in lumpfish. From previous experiments performed at the University of Tromsø, it is known that lumpfish have an increasing immune response up to 600 day degrees post-vaccination. This is a long retention time which practically difficult to implement due to rapid growth in lumpfish. The time taken to achieve satisfactory vaccine protection is not known. The aim of this project has been, therefore, to investigate levels of protection at different times post-vaccination. Vaccine protection was tested after 300, 450, or 780 days following vaccination. The effect of combining dip and intraperitoneal vaccines was also investigated.

In this study, no differences were observed between vaccinated and unvaccinated groups in terms of protection in cohabitant experiments. It took 20-25 days before mortality occurred in all groups, in an acute condition. In i.p. infection testing, there was a measurable degree of protection, in the form of delayed mortality. The overall conclusion from this study is that the vaccine against *A. salmonicida* subtype VI has not provided adequate protection against *A. salmonicida*, and the reasons for which are not clear. Probably there may be a combination of several factors possibly including the composition of the vaccine, infection pressure and the general health of the fish.

Innholdsfortegnelse

FORORD ..... **II**

SAMMENDRAG ..... **III**

ABSTRACT ..... **IV**

INNHOLDSFORTEGNELSE ..... **V**

LISTE OVER FIGURER ..... **VIII**

LISTE OVER TABELLER ..... **X**

1. INNLEDNING **1**

1.1 INTRODUKSJON 1

1.2 LAKSELUS - *LEPEOPHTHEIRUS SALMONIS* 1

1.2.1 Medikamentell behandling mot lakselus *2*

1.2.2 Ikke-medikamentell behandling mot lakselus *3*

1.3 ROGNKJEKS – *CYCLOPTERUS LUMPUS* 4

1.3.1 Rognkjeks i oppdrett *5*

1.3.2 Dagens sykdomsstatus hos rognkjeks i oppdrett *6*

1.4 *AEROMONAS SALMONICIDA* 9

1.4.1 Bakterien Aeromonas salmonicida *10*

1.4.2 Virulensfaktorer i Aeromonas salmonicida *11*

1.4.3 A-lagstyper *12*

1.4.4 Atypisk furunkulose – mottagelige fiskearter *13*

1.5 IMMUNSYSTEMET TIL TELEOSTER 14

1.5.1 Immunsystemet til rognkjeks *16*

1.6 VAKSINERING AV FISK 16

1.6.1 Administreringsmetoder for vaksinering av fisk *18*

1.7 EVALUERING AV VAKSINEBESKYTTELSE 19

1.8 OPPGAVENS PROBLEMSTILLING OG MÅL 22

2. MATERIAL OG METODE **23**

2.1 FORSØKSFISK 23

2.1.1 Vannkvalitet og miljøparametere *23*

2.1.2 Oppfølging av forsøksfisk – daglig tilsyn, veiing og registrering av appetitt *24*

2.2 PILOTFORSØK – PASSERING AV BAKTERIEISOLAT OG BESTEMMELSE AV SMITTEDOSE 24

2.3 FORSØKSOPPSETT 25
2.4 IMMUNISERING AV ROGNKJEKS 27
2.4.1 Vaksinesammensetning 27
2.4.2 Dyppvaksinering 27
2.4.3 Intraperitoneal stikkvaksinering, sortering og merking av fisk 28
2.5 BAKTERIEISOLATER OG SMITTEMATERIALE 29
2.5.1 Bakterieisolater 29
2.5.2 Bekreftelse av tilstedeværelse av A-laget 29
2.5.3 Smitteinokulum 30
2.5.4 Bestemmelse smittedoser 31
2.6 SMITTE AV ROGNKJEKS 31
2.6.1 Karfordeling og antall fisk 31
2.6.2 Utføring av smitte 32
2.7 REGISTRERING AV DØDELIGHET 33
2.8 PRØVETAKING AV FORSØKSFISK 33
2.9 BAKTERIOLOGI 34
2.10 SANNTIDS RT-PCR 34
2.10.1 Utførsel sanntids RT-PCR 35
2.10.2 Primere 35
2.11 HISTOLOGI 36
2.12 ELISA 36
2.12.1 Rognkjeksserum 37
2.12.2 Dyrkning, inaktivering og sonikering av NVI-8013 37
2.12.3 Gjennomføring av ELISA 37
2.13 VANNPRØVER 38
2.14 STATISTIKK 38
3. RESULTATER 39
3.1 PILOTFORSØK – PASSERING AV ISOLAT OG BESTEMMELSE AV SMITTEDOSE 39
3.1.1 Pilotforsøk 1.1 – Passering av isolat Vx1019 39
3.3.2 Pilotforsøk 1.2 – Passering av isolat Vx1025 39
3.3.3 Pilotforsøk 2.1 – Bestemmelse av smittedose (i.p. injeksjonsdose) 41
3.2 FORSØKSFISK 41
3.2.1 Nullprøver 41
3.2.2 Forsøksfisk etter dyppvaksinering 42

3.2.3 Forsøksfisk etter stikkvaksinering *42*
3.2.4 Vektmålinger av forsøksfisk *42*
3.3 SMITTEDOSER 43
3.4 DØDELIGHET 44
3.4.1 Smitteforsøk 300 d°C etter stikkvaksinering *44*
3.4.2 Smitteforsøk 450 d°C etter stikkvaksinering *45*
3.4.3 Smitteforsøk 780 d°C etter stikkvaksinering *47*
3.5 OVERLEVELSESANALYSE – KAPLAN MEIER 48
3.6 KLINIKK 51
3.7 HISTOPATOLOGI 54
3.7.1 Histopatologiske forandringer knyttet til Aeromonas salmonicida *54*
3.7.2 Peritonitt – Bieffekter fra vaksinering *56*
3.7.3 Andre histopatologiske funn *56*
3.8 BAKTERIOLOGI 57
3.8.1 Andre bakteriologiske funn *58*
3.9 SANNTIDS RT-PCR 59
3.10 ELISA 60
3.11 SANNTIDS RT-PCR AV VANNPRØVER 61
4. DISKUSJON 63
5. KONKLUSJON 70
LITTERATURLISTE 71

Liste over figurer

Figur 1: Forbruk av rensefisk. 4

Figur 2: Forsøksoppsett. 26

Figur 3: Dyppvaksinering av rognkjeks. 28

Figur 4: Merking av rognkjeksen ved hjelp av Visual implant elastomer (VIE) 29

Figur 5: *Aeromonas salmonicida* dyrket på CBB 40

Figur 6: Akkumulert dødelighet i pilotforsøk 1.2. 40

Figur 7: Akkumulert dødelighet i pilotforsøk 2.1. 41

Figur 8: Gjennomsnittsvekt til rognkjeks. 43

Figur 9: Akkumulerte dødeligheten etter 300 d°C (kohab) 44

Figur 10: Akkumulerte dødeligheten etter 300 d°C (i.p.). 45

Figur 11: Akkumulert dødelighet etter 450 d°C (kohab) 46

Figur 12: Akkumulerte dødeligheten etter 450 d°C (i.p.) 46

Figur 13: Akkumulerte dødeligheten etter 780 d°C (kohab) 47

Figur 14: Akkumulerte dødeligheten etter 780 d°C (i.p.). 48

Figur 15: Overlevelsesanalyse (Kaplan-Meier) for i.p. smitte 300 døgngrader. 49

Figur 16: Overlevelsesanalyse (Kaplan-Meier) for i.p. smitte 450 døgngrader. 49

Figur 17: Overlevelsesanalyse (Kaplan-Meier) for i.p. smitte 780 døgngrader. 50

Figur 18: Kliniske tegn som ble observert på syk fisk 52

Figur 19: Et utvalg av ytre kliniske tegn 53

Figur 20: Typisk indre bilde. 54

Figur 21: Histologisnitt av hjerte 55

Figur 22: Histologisnitt av gjeller. 55

Figur 23: Histologisnitt av pankreasvev. 56

Figur 24: Histologisnitt av levervev. 57

Figur 25: Histologisnitt av levervev. 57

Figur 26: Vekst av *A.salmonicida* på BA fra nyreutstryk. 58

Figur 27: Kolonier morfologisk forenlig med *Vibrio splendidus* 59

Figur 28: Sanntids RT-PCR fra smitteforsøk 300 d°C. 60

Figur 29: Sanntids RT-PCR fra smitteforsøk 450 d°C 60

Figur 30: Sanntids RT-PCR fra smitteforsøk 780 d°C 60

Figur 31: Fortynningsserie av serum-pools i ELISA test 61

Figur 32: Sanntids RT-PCR av vannprøver. 62

Liste over tabeller

Tabell 1: Tilgjengelige vaksiner til rensefisk per 2016 17

Tabell 2: Europeiske retningslinjer for effekt, sikkerhet og intensitet i vaksineforsøk 21

Tabell 3: Tlike vannparameterne under forsøksperioden. 23

Tabell 4: Smittemetode, ønsket smittedose og faktisk smittedose i pilotforsøk 25

Tabell 5: Snittvekt og antall rognkjeks som ble dyppvaksinert. 27

Tabell 6: VIE-merking av de ulike rognkjeksgruppene. 28

Tabell 7: Ønskede doser for smitteforsøk 31

Tabell 8: Antall og fordeling av rognkjeks i smittforsøk etter 300 d°C 32

Tabell 9: Antall og fordeling av rognkjeks i smitteforsøk etter 450 d°C 32

Tabell 10: Antall og fordeling av rognkjeks i smittforsøk etter 780 d°C 32

Tabell 11: Primersekvenser og probesekvenser brukt i sanntids RT-PCR 36

Tabell 12: Ønskede smittedoser og faktiske smittedoser 43

Tabell 13: Oversikt over mean time to death, RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet 50

Tabell 14: Oversikt over mean time to death, RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet. 51

Tabell 15: Oversikt over mean time to death, RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet. 51

Tabell 16: Andel individer som var positive for vekst av *A.salmonicida*. 58

1. Innledning

1.1 Introduksjon

Akvakultur representerer en lønnsom næring i Norge, i følge statistisk sentralbyrå ble det i 2015 solgt 1,39 millioner tonn matfisk med en omsetning på 46,7 milliarder kroner, med Atlantisk laks (*Salmo salar*) som viktigste oppdrettsart (SSB, 2016).

Veien til dagens store produksjonsnivå har ikke vært problemfri, og infeksiøse sykdommer har vært og er fortsatt, en viktig årsak til store biologiske og økonomiske tap med 20 prosent svinn i snitt i dagens oppdrett (Hjeltnes, 2017). Noen av de store historiske flaskehalsene har vært bakteriesykdommene vibriose (*Vibrio anguillarum*), kaldtvannsvibriose (*Vibrio salmonicida*) og furunkulose (*Aeromonas salmonicida*) som medførte et svært høyt forbruk av antibiotika på 80- og tidlig 90-tallet. Injeksjonsvaksine med oljeadjuvans viste seg å være en effektiv løsning, og antibiotikaforbruket gikk deretter ned (Sommerset et al., 2014). I dag er bakteriesykdommer i oppdrett av laksefisk forholdsvis stabil takket være effektive vaksiner, i følge fiskhelserapporten 2016 (Hjeltnes, 2017). Virussykdommer er, derimot, en stor helseutfordring med hyppigst forekomst av sykdommene PD, HSMB og CMS. Allikevel er lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) i dag den største helserelaterte utfordringen innen oppdrett av laksefisk i Norge (Hjeltnes, 2017).

1.2 Lakselus - *Lepeophtheirus salmonis*

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) hører til Crustacea, krepsdyr, og er en marin ektoparasitt som fester seg på huden til verten. Den har en utbredelse på den nordlige halvkule og forekommer på de fleste artene i slektene *Salmo* og *Oncorhynchus* (Kabata, 1979). Lakselusa har 8 forskjellige stadier i livssyklusen og hvert stadium er adskilt med et skallskifte (Hamre et al., 2013). Den beiter på huden til verten hvor den livnærer seg av slim, hud og blod. Ved høye antall lus kan dette medføre dype sår som videre kan resultere i osmotisk stress, sekundære infeksjoner og anemi. Livsstadiet til fisken er en viktig faktor for infeksjonsintensitet, hos en smolt vil fem voksne lus kunne medføre en alvorlig trussel i helsetilstanden (Pike, 1989).

Lakselusa har et høyt reproduksjonspotensial, en voksen hunnlus kan overleve opptil 191 dager ved 7,2°C og produsere 11 par eggstrenger. Hver eggstreng kan ha et varierende antall egg, fra 55 til 704 (Heuch et al., 2000). Lakselusa sin høye reproduksjonsevne er adaptert til biologien til laksefisk som har et vandringsmønster der den migrer bort fra kysten til det åpne hav, som fører til en lav vertstetthet. Oppdrett av laks og regnbueørret har endret tetthet og antall verter for lakselusa, og det store antallet oppdrettsfisk i sjøen fører til økt smittepress. Produksjon av lakselus i oppdrett vurderes som en alvorlig trussel mot ville laksefisk, spesielt sjøørret (*Salmo trutta*) og Arktisk røye (*Salvelinus alpinus*) i sjøvann (Heuch et al., 2005). På bakgrunn av de alvorlige konsekvensene lakselus kan ha, spesielt for villfisk, har det blitt iverksatt lakseluskontroll som er regulert av en egen forskrift (luseforskriften). Det skal i oppdrett til enhver tid være færre enn et gjennomsnitt på 0,5 hunnlus per fisk, og det skal iverksettes tiltak som sørger for at denne grensen alltid overholdes. I alvorlige tilfeller hvor grensen ikke blir overholdt kan utslakting av fisken være pålagt. For å holde lusenivåene på et akseptabelt nivå gjennomføres det medikamentell, mekanisk og biologisk avlusning, og i områder med høyt smittepress må dette hyppig utføres. I tillegg kreves det en samordnet våravlusning dersom det er mer enn 0,1 lakselus per fisk i kystfylkene fra Rogaland til Finnmark. Felles våravlusning er et tiltak for å gi lavest mulig smittepress for utvandrende vill laksesmolt (Lovdata.no, 2012).

1.2.1 Medikamentell behandling mot lakselus

Medikamentell behandling har i mange år vært den metoden som har blitt brukt i størst grad. Medikamentell avlusning deles inn i to hovedgrupper, badbehandling og oral behandling, etter hvordan legemiddelet administreres. Pyretroider, organofosfater og hydrogenperoksid administreres via badbehandling. Dette kan skje ved hjelp av presenning eller brønnbåt. Kitinsyntesehemmere og avermektiner administreres oralt der legemiddelet er lagt inn i fôret (Burridge et al., 2010).

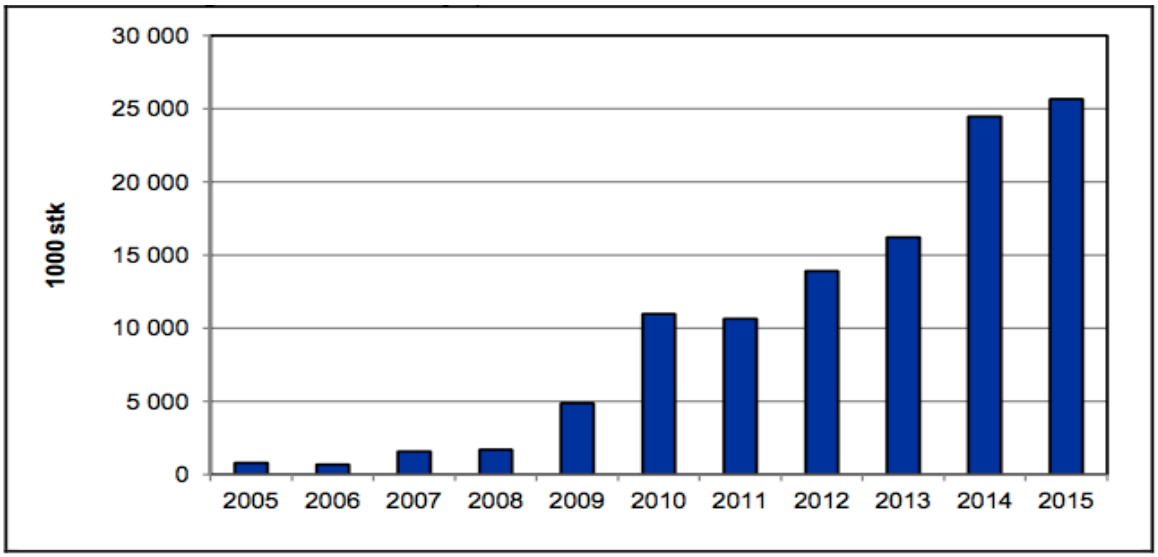
Tiltak og kontroll av lus i sjø påfører akvakultur enorme utgifter. Globalt ble det estimert at det ble brukt i overkant av 300 millioner euro i 2006 (Costello, 2009). I Norge er kostnadene knyttet til lakselus beregnet til mellom 3 og 5 milliarder kroner, men tallet er noe usikkert (Sundnes, 2016). Høye utgifter er ikke det eneste problemet, resistensutvikling hos lakselus og miljøbelastning er to andre alvorlige konsekvenser ved bruk av hyppig medikamentell avlusning. Nedsatt følsomhet hos lakselus mot organofosfater ble rapportert for første gang i 1990 i Norge, mot pyretoider i 1998 og mot emamectin benzoate i 2007 (Dalvin, 2010). Det

ble også rapportert nedsatt følsomhet mot hydrogenperoksid i 2014 (Helgesen et al., 2015). Noen lakseluspopulasjoner har nedsatt følsomhet for flere ulike kjemikalier, og siden det er få godkjente kjemikalier som kan brukes til avlusning, er multiresistente lakselus svært problematisk (Dalvin, 2010). Som en konsekvens av dette har det blitt et økt behov for ikke-medikamentelle behandlingsformer mot lakselus.

1.2.2 Ikke-medikamentell behandling mot lakselus

De senere år har det vært et økt behov for ikke-medikamentelle behandlingsformer mot lakselus, og i dag benyttes biologisk- og mekanisk avlusning som alternative metoder. I 2016 var det en markant reduksjon i bruken av legemidler mot lakselus, samtidig hadde bruken av mekaniske behandlinger en seksdobling fra 2015 (Hjeltnes, 2017). Det finnes flere ulike løsninger for mekaniske behandlinger mot lakselus som ferskvannsbehandling, gjerne i kombinasjon med temperaturøkning, vakuumdannelse, vannspyling eller børster og laserbehandling (Hjeltnes, 2017). Funksjonelt fôr kan forebygge mot lus, men en av de viktigste forebyggende tiltakene mot lakselus er bruk av rensefisk.

Rensefisk er en felles betegnelse som inkluderer ulike arter av leppefisk og rognkjeks. I oppdrett av laks og regnbueørret brukes rensefisk som en biologisk avlusningsmetode der den spiser lakselus som den finner på laksen. Rensefisk kan dermed holde lusenivået nede på en effektiv og miljøvennlig måte. Artene av leppefisk som brukes er bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*), berggylt (*Labrus bergylta*), grønngylt (*Symphodus melops*), grasgylt (*Centrolabrus exoletus*) og noe rødnebb (*Labrus mixtus*). Mesteparten av leppefisken som blir brukt er villfanget, mens all rognkjeks er oppdrettet (Skiftesvik, 2016). Bruken av rensefisk har økt kraftig de senere årene (Figur 1), i 2015 ble det satt ut over 25 millioner rensefisk i norsk akvakultur (Fiskeridirektoratet, 2016b). Rognkjeks er nå regnet som Norges nest største oppdrettsart (Waatevik, 2017)



Figur 1: Forbruk av rensefisk fra 2005 til 2015 i norsk akvakultur (både villfanget og oppdrettet). Tallene er oppgitt 1000 stykker (Figur hentet fra www.fiskeridirektoratet.no).

Bruken av leppefisk som rensefisk kan dokumenteres tilbake på midten av 70-tallet. Mot slutten av 80-tallet kom de første tegnene til resistens hos lakselus, og dette ledet til at et fåtall av oppdrettere forsøkte å bruke villfanget leppefisk til å holde lusenivåene ned. Kort tid etter dette ble det beskrevet lovende resultater for leppefisk som avlusningsmetode (Bjordal, 1988, Sundnes, 2016). Bruken og interessen for rensefisk har variert med introduksjon og effekt av legemidler mot lakselus, og den høye interessen de senere år er et resultat av multiresistente lakselus (Kvenseth, 2011).

Bruken av rognkjeks som rensefisk i akvakultur er, i motsetning til leppefisk, relativt nytt. Oppdrett av rognkjeks var opprinnelig rettet mot produksjon av kaviar, men i 2011 ble det konstatert at rognkjeks fungerer som rensefisk (Sundnes, 2016).

1.3 Rognkjeks – *Cyclopterus lumpus*

Rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, er utbredt på begge sider av den nordlige delen av Atlanterhavet, langs vestkysten fra New Jersey i USA til Grønland og langs østkysten fra Portugal til Barentshavet (Hureau et al., 1986), den er en vanlig art langs hele norgeskysten (Pethon and Nyström, 1998).

Rognkjeksen har en kompakt og dråpeformet kroppsform, og arten er svært karakteristisk med tykk hud, manglende skjell og 7 rader benknuter langs sidene og buken. Den har et nesten firkantet utseende, som skyldes at den fremste ryggfinnen er skjult av en kam med

benknuter (Pethon and Nyström, 1998). Langs buken har rognkjeks en stor sugeskive dannet av bukfinnene. Denne brukes til å feste seg til steiner, tang eller annet underlag ved hjelp av vakuumdannelse fra 16 fordypninger i ytre ring (Davenport, 1985). Rognkjeks mangler svømmeblære (Davenport and Kjørsvik, 1986). For å kontrollere oppdriften har den utviklet et lettere skjelett laget av brusk og høyt vanninnhold som gir geleaktig vev, som gjør det minst mulig energikrevende å holde seg flytende i sjøvann (Davenport, 1985).

I norsk tale er hunnene omtalte som rognkjeks og hannene som rognkall. At arten har to ulike navn henger trolig sammen med at rognkjeksen er seksuell dimorforlog. Rognkjeksen kan bli opptil 63 cm og 5,5 kg (Pethon and Nyström, 1998). Rognkallen er mindre enn rognkjeksen, men har enn større sugeskive. Under gytesesongen utvikler arten dype farger som skiller kjønnene fra hverandre, rognkallen får en rødlig farge mens rognkjeksen får en blågrønn tone (Davenport, 1985).

Voksne rognkjeks lever pelagisk i de øvre vannmassene, men om våren kommer fisken inn til kysten for å gyte i fjæra. Gytesesongen varer fra februar til mai, hunnene gyter omtrent 200.000 egg (Pethon and Nyström, 1998). Under gyting inviteres rognkjeksen av rognkallen til en passende gyteplass som han vokter over. Her gyter hun en eggklump som kleber seg fast til steiner og alger i fjæra (Bakketeig., 2016). Etter befruktning vokter rognkallen over eggene, vifter friskt vann over de ved hjelp av brystfinnene og forsvarer de mot predatorer. Eggene klekker rundt 60 dager etter gyting. Etter klekking holder yngelen seg i strandsonen i ett til to år før den vandrer ut til de frie vannmassene (Pethon and Nyström, 1998).

Under gyteperioden tar ikke rognkjeksen til seg næring, resten av året er det viktigste næringsgrunnlaget for voksne individer pelagiske krepsdyr og maneter (Pethon and Nyström, 1998).

1.3.1 Rognkjeks i oppdrett

Oppdrett av rognkjeks til avlusningsformål startet opp i 2011 og det har vært en kraftig økning i produksjon i løpet av kort tid. I 2015 ble det produsert over 11 millioner rognkjeks av 19 ulike aktører (Fiskeridirektoratet, 2016a).

Oppdrett av rognkjeks baserer seg i dag hovedsakelig på at vill stamfisk fanges inn og strykes, men det er et ønske om å få en fullstendig lukket produksjonssyklus. Det er trolig flere fordeler med en lukket syklus, som rognkjeks bedre tilpasset oppdrettsmiljøet, mindre infeksjonsrisiko og målrettet avlsarbeid (Drangsholt et al., 2015).

Under naturlig kjønnsmodning strykes rognkjeksen og eggene inkuberes i 8-11 °C i svak belysning, klekkingen skjer vanligvis mellom 280-300 d°C, og larvene kan fôres med tørrfôr direkte. Rognkjeks leveres for sjøsetting når den er mellom 10-35 gram med en produksjonstid på 6-9 måneder (Jonassen, 2016b).

En av utfordringene innen rognkjeksproduksjon er at den vokser raskt samtidig som den blir mindre effektiv som lusespiser med økende størrelse. I et forsøk ble det vist at rognkjeks med en gjennomsnittsvekt på 54 gram er mer effektiv som lusespiser enn rognkjeks med en gjennomsnittsvekt på 360 gram (Imsland et al., 2014). En mulig forklaring kan være at store rognkjeks heller spiser lett tilgjengelige laksepellet.

En fordel med rognkjeks som rensefisk er at den spiser lus i forholdsvis kaldt vann. Leppefisk er derimot noe mer varmekjære arter som fungerer dårlig som rensefisk om vinteren og i de nordligste delene av landet (Skiftesvik, 2016).

Hvor effektiv rognkjeksen er som lusespiser avhenger mye av miljøforhold, i tillegg til størrelse. Rognkjeks lever naturlig i tareskog når de er juvenile (Ingólfsson et al., 2002), og for at rensefisken skal trives og fungere godt i merdene behøver de egne skjul hvor de kan oppholde seg. I tillegg skal de jevnlig ha eget fôr, beiting på laksen etter lakselus er ikke tilstrekkelig for å dekke næringsbehovet til rensefisk (Skiftesvik, 2016).

1.3.2 Dagens sykdomsstatus hos rognkjeks i oppdrett

Det er en oppfatning om at overlevelsen er generelt lav hos rensefisk (Hjeltnes, 2017), infeksjonssykdommer er en av flere viktige årsaker til høye tap av rensefisk. Siden bruken av rensefisk med dagens kvantum er relativt nytt er kunnskapen om ulike infeksiøs agens mangelfull, og det kan forventes at nye sykdommer og patogener identifiseres i fremtiden (Johansen et al., 2016). I tillegg er det behov for bedre kunnskap om ernæringskravene til rognkjeks (Sæle, 2017). I kartleggingprosjekt av dødelighet hos rensefisk i 2013 ble det registret en dødelighet opptil 48 prosent hos rognkjeks etter utsett (Nilsen et al., 2014).

Den høye dødeligheten er trolig knyttet til flere årsaker, men Fiskehelserapporten fra 2016 beskriver bakterielle infeksjoner som den største utfordringen innen rensefiskhelse (Hjeltnes, 2017). Andre årsaker som medfører et alvorlig dødelighetsbilde er gjerne driftsmessige problemer knyttet til anlegget som notvask, vær og medikamentell behandling av laks mot lakselus (Nilsen et al., 2014).

1.3.2.1 Virussykdommer

Det foreligger ingen krav om rutinemessig testing etter virale agens av rensefisk brukt i oppdrett. Siden det er et begrenset antall fisk som er undersøkt er det derfor store kunnskapshull om forekomsten av virusinfeksjoner hos rensefisk (Johansen et al., 2016). Viral hemoragisk septikemi virus (VHSV) ble i september 2015 påvist i villfanget rognkjeks i et anlegg på Island (Johansen et al., 2016). Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) ble i 2015 påvist i rognkjeks på tre ulike lokaliteter i Nordland og Sør-Trøndelag (Bornø et al., 2016). Og det har i den senere tid blitt påvist et nytt virus i flere tilfeller av en privat aktør (Hjeltnes, 2017). Lumpfish flavivirus (LFV) er sterkt assosiert med leverpatologi, men det er ingen publisert kunnskap om hvor stor betydning det har for helsetilstanden til rognkjeks (Nylund, pers. comm).

1.3.2.2 Parasitter

Det er flere ulike parasitter som er påvist hos rognkjeks. Mikrosporiden *Nucleospora cyclopteri* er kun kjent fra rognkjeks, og er flere ganger funnet i villfanget rognkjeks langs norskekysten. I oppdrett av rognkjeks i Canada er parasitten knyttet til dødelighet (Karlsbakk, 2014). I 2015 ble *N. cyclopteri* og *Kudoa islandica* påvist hos oppdrettet rognkjeks i Norge, høy dødeligheten på 65 % var i dette tilfellet trolig knyttet til *N. cyclopteri* (Alarcón et al., 2016b). *N. cyclopteri* er betraktet som et alvorlig patogen for rognkjeks (Johansen et al., 2016).

Amøben *Paramoeba perurans* som forårsaker amøbisk gjellesykdom (AGD) er påvist hos en rekke fiskearter, deriblant rognkjeks. Amøben blir betraktet som et alvorlig patogen for både rensefisk og laksefisk (Karlsbakk, 2014). I et eksperimentelt forsøk er det vist at rognkjeks utvikler AGD, men sykdomsforløpet går saktere enn hos Atlantisk laks. I samme forsøk ble det vist at rognkjeks kan opptre som en bærer og overføre *P. Perurans* til Atlantisk laks (Haugland et al., 2016).

Det finnes flere ulike ektoparasitter som er påvist i rognkjeks, men det ser ikke ut til at de er forbundet med dødelighet. *Trichodina cyclopteri* og *T. galyae* er to arter av ciliater som er alminnelig å finne på gjellene til villfanget rognkjeks (Karlsbakk, 2014). Det kommer også frem i fiskehelserapporten at det er gjort sporadiske funn av ulike ciliater på gjellene til rensefisk uten at det er knyttet til større helseproblemer (Hjeltnes, 2016). Andre parasitter som kan opptre på gjellene til rognkjeks er gjellemarken *Lernaeocera branchialis*, en egen

rognkjeksvariant av gjelleflagellaten *Ichthyobodo* sp. (Karlsbakk, 2014) og *Gyrodactylus* sp. (Hjeltnes, 2017).

En annen alminnelig ektoparasitt hos rognkjeks er *Caligus elongatus*, bedre kjent som skottelus. Store mengder skottelus påvises ofte og er festet til hudens beinplater. Funn tyder på et det finnes en genetisk variant av skottelusen som særlig er knyttet opp mot rognkjeks (Karlsbakk, 2014).

1.3.2.3 Bakterielle sykdommer

Bakterielle lidelser ser i dag ut til å være den viktigste årsaken til dødelighet hos rognkjeks i oppdrett (Nilsen et al., 2014, Bornø et al., 2016, Hjeltnes, 2017). Bakterier kan gjerne opptre i en blandingsflora hos syk eller død fisk og dermed kan det være vanskelig å stille nøyaktig dødsårsak (Nilsen et al., 2014). De mest alvorlige bakterielle problemene som er forbundet med akutt dødelighet hos rognkjeks etter utsett er vibriose (*Vibrio anguillarum* O1/O2a og *Vibrio ordalii*), pasteurellose (*Pasteurella* sp.) og atypisk furunkulose (*Aeromonas salmonicida*) (Nilsen et al., 2014, Karlsbakk, 2014, Alarcón et al., 2016a).

Veterinærinstituttet sin Fiskehelserapport 2016 rapporterer at *Aeromonas salmonicida* er fortsatt ett av de viktigste sykdomsagenset for rognkjeks. Men det har vært en reduksjon i antall positive lokaliteter siden 2015 (Hjeltnes, 2017). Atypisk *A. salmonicida* kan deles inn i ulike subtyper basert på variasjoner i sekvensen på *vapA* genet som koder for A-lagsproteinet og de ulike subtypene viser en rimelig høy grad av artsspesifisitet (Gulla, 2015). A-lagstype VI er påvist i over 95 % av tilfellene av isolering fra rognkjeks i 2015, mens resterende 4,88 % tilhører A-lagstype V. Det har også vært påvist flere tilfeller av A-lagstype I i et begrenset geografisk område, dette representerer trolig infeksjoner fra villakspopulasjoner (Bornø et al., 2016, Hjeltnes, 2017).

Det var 12 lokaliteter med påviste tilfeller av *Vibrio anguillarum* og en påvist lokalitet av *Vibrio ordalii* i rognkjeks i 2016, i følge Fiskehelserapporten 2016 (Hjeltnes, 2017). Det ser ut til at serotype O1 er den varianten som er mest vanlig hos rognkjeks, men serotype O2a og O2a biotype II har også blitt påvist i tilfeller (Hjeltnes, 2016). *V. anguillarum* serotype O1 og *V. ordalii* er også påvist i villfanget rognkjeks i Skottland (Marcos-López et al., 2013).

I 2016 ble det påvist *Pasteurella* sp. ved 28 ulike lokaliteter , som er en dobling siden 2015 (Hjeltnes, 2017). *Pasteurella* sp. er en bakterie som nylig har blitt beskrevet hos rognkjeks i oppdrett, og er nært beslektet med *P. skyensis* (Birkbeck et al., 2002). Bakterien rammer rognkjeks i alle de ulike produksjonsstadiene (Alarcón et al., 2016a).

Pseudomonas anguilliseptica ble påvist ved 8 lokaliteter i 2016 (Hjeltnes, 2017), bakterien er opprinnelig beskrevet fra japansk ål (Wakabayashi and Egusa, 1972), men ser ut til å være patogen for flere andre fiskearter, blant annet atlantisk laks, regnbueørret, havabbor og piggvar (Wiklund and Bylund, 1990, Berthe et al., 1995). Bakterien har en endemisk utbredelse på Færøyene hos rognkjeks (Colquhoun, pers. comm).

Det er isolert sårbakterier fra rognkjeks som *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* sp. (Bornø et al., 2016, Småge et al., 2016). Flere ulike vibrioarter er isolert fra rognkjeks, *Vibrio logei*, *Vibrio splendidus*, og *Vibrio wodanis*, men betydningen av disse er uklar (Bornø et al., 2016).

Piscirickettsia salmonis ble nylig påvist i et sykdomsutbrudd hos oppdrettet rognkjeks i Irland (Marcos-López et al., 2017).

1.3.2.4 Ukjente sykdomslidelser

Det er mange uløste utfordringer knyttet til rensefiskhelse, og mye av dødeligheten er trolig knyttet til ukjente sykdommer, det er derfor et behov for økt kunnskapsoppbygging rundt helse og verferd hos rensefisk (Hjeltnes, 2017). Leverpatologi har vært observert hos rognkjeks i flere tilfeller, men årsak til dette er ukjent (Colquhoun, pers. comm).

Katarakt er en øyelidelse der linsen blir blakket som kan medføre redusert eller fullstendig tap av syn. Katarakt er i dag et problem i oppdrettet rognkjeks, og et svekket syn kan sannsynligvis medføre redusert vekst, overlevelse og evne som lusespiser. I et forsøk finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskingsfond ble forekomst og mulige årsaker til katarakt hos rognkjeks kartlagt. Undersøkelsen viste at katarakt opptrer i svært varierende grad med stor variasjon i alvorlighetsgrad (Jonassen, 2016a). Alvorlighetsgraden økte med fiskens alder der yngel hadde relativt lite katarakt mens nesten samtlige stamfisk hadde det (Waagbø, 2016). Årsaken er ikke kjent, og kan muligens være knyttet til ernæring, genetikk, mekanisk skade og stress (Waagbø, 2016, Jonassen, 2016a).

1.4 *Aeromonas salmonicida*

Aeromonas salmonicida er kanskje den mest studerte fiskebakterien, og det finnes sannsynligvis mer litteratur om *A. salmonicida* enn noe annet bakterielt fiskepatogen. *A. salmonicida* har en global utbredelse, et bredt omfang av ulike verter og har ført til enorme tap innen oppdrett av fisk, spesielt kostbare laksefisk. *A. salmonicida* ble allerede isolert og beskrevet i 1894 av Emmerich og Weibel i Tyskland i forbindelse med et utbrudd i

ørretoppdrett, bakterien ble da kalt Bacillus der Forellenseuhe (Austin and Austin, 2016). Opp i gjennom årene har *A. salmonicida* gjennomgått flere taksonomiske reklassifiseringer, i dag tilhører den genus *Aeromonas* i familien Aeromonadaceae (Griffin et al., 1953, Colwell et al., 1986). Det er i dag beskrevet fem ulike underarter av *A. salmonicida*: subsp. *salmonicida* (Lehmann and Neumann, 1896, Schubert, 1967), subsp. *achromogenes* (Smith, 1963, Schubert, 1967), subsp. *masoucida* (Kimura, 1969*)*, subsp. *smithia* (Austin et al., 1989) og subsp. *pectinolyctica* (Pavan et al., 2000). Førstnevnte, subsp. *salmonicida*, omtales som typisk *A. salmonicida*, denne stammen er svært homogen og rammer salmonider med noen få unntak, sykdommen er kjent som klassisk furunkulose (Austin and Austin, 2016). De resterende underartene, subsp. *achromogenes,* subsp. *masoucida,* subsp. *smithias* og subsp. *pectinolyctica* omtales av de fleste som atypiske stammer av *A. salmonicida*, i tillegg er det et høyt antall stammer som ikke hører til disse underartene som også blir referert til som atypisk *A. salmoncida.* Sykdommen omtales gjerne som atypisk furunkulose (Wiklund and Dalsgaard, 1998).

1.4.1 Bakterien *Aeromonas salmonicida*

A. salmonicida er en gram-negativ ubevegelig stavformet, fakultative anaerobt bakterie som har evnen til å fermentere glukose, er resistent mot vibriostat O/129, er både katalase- og oksidasepositiv, og danner brunlige pigmenter ved dyrkning (Austin and Austin, 2016).

A. salmonicida subsp. *salmonicida* er forholdsvis homogen i fenotypiske egenskaper. Atypiske isolater er derimot en heterogen gruppe med hensyn til biokjemiske egenskaper (Wiklund and Dalsgaard, 1998), og kan skille seg fra typiske isolater ved manglende eller redusert pigmentproduksjon og langsommere vekst (Chapman et al., 1991, Wiklund and Dalsgaard, 1998, Austin and Austin, 2016). I tillegg produserer nesten samtlige stammer av atypiske isolater syre fra sakkarose, i motsetning til de fleste typiske isolater (Austin and Austin, 2016).

I flere tilfeller har det vist seg at både typiske og atypiske isolater har hatt fravikende fenotypiske egenskaper enn de fastsatte biokjemiske egenskapene. Det har blant annet blitt isolert typiske stammer som ikke har evnen til å produsere pigmenter (Wiklund and Bylund, 1993, Koppang et al., 2000) og det har blitt påvist isolater av *A. salmonicida* som har evnen til å bevege seg (McIntosh and Austin, 1991).

1.4.2 Virulensfaktorer i *Aeromonas salmonicida*

Begrepet 'virulensfaktor' beskriver egenskaper til en bakterie som er knyttet til dens evne til å fremkalle sykdom hos verten, eksempler kan være toksinproduksjon, adhesjon, flageller og quorum sensing, disse egenskapene skal gi bakterien et fortrinn til å vokse og overleve ved at den overvinner forsvarsmekanismene til verten (Dallaire-Dufresne et al., 2014).

Adhesiner er proteinstrukturer på bakterien som er ansvarlig for å danne kontakt mellom vert og bakterie. *A. salmonicida* har flere ulike typer adhesiner og det skilles mellom filamentøse strukturer, som flageller og pilier, og ikke-filamentøse strukturer, som LPS, kapsel og yttermembran proteiner (Beaz‐Hidalgo and Figueras, 2013).

I gram-negative bakterier finnes det fire ulike pilityper (I-IV), kartlegging av genomet til *A. salmonicida* viser at den har type IV pili (Reith et al., 2008), som trolig er viktig for epitelcelleadherenser, kolonisering og dannelse av biofilm (Masada et al., 2002, Beaz‐Hidalgo and Figueras, 2013).

Lipopolysakkarider, kjent som LPS, er sukkerkjeder som er forankret i bakteriecellens yttermembran som er viktig for inflammatorisk aktivitet, integriteten og funksjonen til cellemembranen (Wang et al., 2007). LPS-kjedene består av tre ulike deler, et lipid A som er selve forankringen til yttermembranen, core-polysakkarider som et mellomledd og de ytterste O-polysakkaridene som er svært immunogene i fisk (Gudmundsdóttir and Björnsdóttir, 2007). LPS-kjedene til *A. salmonicida* kan inndeles i tre ulike varianter, type A, B og C, basert på struktur og sammensetning i O-polysakkaridkjedet (Wang et al., 2007). Videre er det funnet ut at hver av de fem ulike underartene av *A. salmonicida* har en egen unik struktur på O-polysakkaridkjedet (Jimenez et al., 2009).

Det er også vist at *A. salmonicida* har type III sekresjonssystem (Burr et al., 2002), som er en nålelignende struktur som injiserer toksinet AexT inn i vertscellen, og spiller trolig en viktig rolle for kolonisering (Dacanay et al., 2006).

A. salmonicida er omsluttet av et regelmessig proteinlag, som kalles A-lag (additional layer) eller S-lag (surface layer) (Udey and Fryer, 1978). A-lagsproteinet er forankret i LPS-kjedene og danner overflaten på *A. salmonicida*, med unntak av O-polysakkarider som kan stikke opp i mellom A-lagsproteiner (Belland, 1985). A-lagsproteiner er organisert i en tetragonal struktur med en molekylvekt ca. 50 kDa, som gjør det svært stabilt og motstandsdyktig (Kay et al., 1981). A-lagsproteinene gir *A. salmonicida* en hydrofob overflate som gjør det lettere å feste seg til og invadere vertsceller (Evenberg and Lugtenberg, 1982). A-laget ser ut til å være

en essensiell virulensfaktor, og spiller trolig en svært viktig rolle for etablering av infeksjon i verten, og det har flere ulike virulensmekanismer. Ved hjelp av det hydrofobe A-lagsproteiner kan *A. salmonicida* feste seg til, entre, overleve og replisere innvendig i makrofager (Daly et al., 1996, Garduño et al., 2000), er resistent mot komplementsystemet (Munn et al., 1982) og kan binde seg til vertscellen sine ekstracellulære molekyler som immunglobuliner og fibronectin, som muligens gir kamuflasje for verten sitt immunsystem (Phipps and Kay, 1988, Doig and Emödy, 1992). Når bakterien passeres i flere omganger, spesielt ved høye temperaturer ved 25 ºC, vil den lett miste A-laget (Ishiguro et al., 1981).

Jern er helt essensielt for veksten til bakterien, men hos verten er jern bundet til vertens proteiner. For å kunne konkurrere mot de jernbindende proteinene produserer *A. salmonicida* ekstracellulære molekyler, sideroforer, som har høy affinitet til jern (Kay et al., 1985, Hirst et al., 1991, Hirst and Ellis, 1994).

A. salmonicida har også flere andre virulensmekanismer som har en viktig rolle for vekst og overlevelse, blant annet produksjon av ekstracellulære molekyler , som diverse proteaseenzymer (Rockey et al., 1988) og toksinet GCAT (Ellis, 1991), Quorum sensing (Swift et al., 1997) og kapseldannelse (Garrote et al., 1992).

1.4.3 A-lagstyper

Det har i senere tid blitt foreslått en helt ny måte å kategorisere *A. salmonicida* på der bakterien deles inn i grupper basert på variasjoner i genet *vapA*, som koder for A-lagsprotein. De ulike A-lagstypene av *A. salmonicida* viser en rimelig høy grad av artsspesifisitet, og typing tyder på at genet *vapA* til *A. salmonicida* kan være en god markør for vertstilpasning (Gulla et al., 2015). I undersøkelsen ble 378 isolater av både typisk og atypisk *A. salmonicida* sekvensert, og resultatene viser at det er en sammenheng mellom A-lagstype og fiskeart. Alle isolatene av typisk *A. salmonicida* (subsp. *salmonicida*) tilhørte samme A-lagstype, og har blitt gruppert til A-lagstype I. De resterende andre isolatene har blitt gruppert til A-lagsgruppe II – XIV, basert på likheter i *vapA*. Men det finnes trolig mer enn 21 A-lagtyper (Colquhoun, pers. comm). For rognkjeks er den dominerende A-lagstypen VI, men i undersøkelsen var det også enkelte isolater fra rognkjeks med A-lagstype I, II, III og V (Gulla, 2015).

1.4.4 Atypisk furunkulose – mottagelige fiskearter

A. salmonicida har et mangfoldig vertsregister både i sjø- og ferskvann. I tillegg til å infisere salmonider er den detektert i fiskearter fra familiene Cyprinidae (karpefisk), Serranidae (havabborer), Percidae (abborfamilien), Anoplopomatidiae (sabelfisk), Petromyzontidae (niøyer), Anguillidae (ferskvannsål), Clupeidae (sildefamilien), Gadidae (torskefamilien), Scophthalmidae (venstrevendte flyndrefisk), Pleuronectidae (høyrevendte flyndrefisk), Anarhichadidae (steinbiter), Esocidae (gjedder), Ammodytidae (sandåler), Sebastidae (steinfisk), Ictaluridae (dvergmallefamilien), Cottoidae (ulkefamilien), Labridae (leppefisker), Sparidae (havkarusser), Soleidae (tunger), Sciaenidae (ørnefisker), flere ulike familier innenfor ordenen Siluriformes (maller) og Cyclopteridae (rognkjekser) (Wiklund and Dalsgaard, 1998, Austin and Austin, 2016, Hellberg et al., 1996, Dalsgaard, 1998, Kim et al., 2013).

Furunkulose er i laks beskrevet som akutt, perakutt, subakutt eller kronisk (Bruno et al., 2013). Det kroniske, og subakutte, sykdomsforløpet oppstår oftest hos eldre fisk med lav dødelighet. Fisken kan opptre letargisk, ha ytre blødninger og byller, og indre blødninger og granulomer i muskel og organer. Det akutte sykdomsforløpet er mest vanlig, og det oppstår ofte høy dødelighet med få eller ingen ytre tegn. Bakterien spres systemisk som fører til septikemi og blødninger i indre organer, og det kan også forekomme granulomer. Den perakutte varianten rammer ofte yngre fisk og medfører ofte høy og rask dødelighet med få eller ingen ytre tegn (Austin and Austin, 2016).

Infeksjoner av *A. salmonicida* i andre fiskearter enn salmonider kan gi et varierende bilde av kliniske tegn og sykdomsforløp, det er flere faktorer som spiller inn, blant annet fiskeart, alder på fisken, miljøbetingelser og virulensegenskapene til bakterien. I flere fiskearter kan sykdomsbilde være ulcerøse tilstander, gjerne i hud, og en systemisk infeksjon (Wiklund and Dalsgaard, 1998). Betegnelse av sykdommen varierer ut i fra tilstand og fiskeart. Infeksjoner forårsaket av *A. salmonicida* omtales i karper som erytrodermatitt (Fijan and Mawdesley-Thomas, 1972), ulcussykdom/sårsyke i gullfisk og skrubbe (Whittington et al., 1987, Wiklund and Bylund, 1993), head ulcer disease i ål (Hidaka et al., 1983), og atypisk furunkulose i andre fiskearter (Wiklund and Dalsgaard, 1998). Ordet furunkulose beskriver sykdomstilstanden der det ofte utvikles furunkler i hud, muskelvev og/eller indre organer (Austin and Austin, 2016)

Atypisk furunkulose, hos arter som laksefisk, torsk, steinbit, kan føre til at fisken får redusert appetitt, mørkere hud og økt dødelighet. Ytre tegn kan opptre som blødninger ved finnebasis

og hudsår. Ved obduksjon kan indre tegn være serøse overflater, blødninger i indre organer og i tarmslimhinnen. (Poppe and Bergh, 2002). I tidligere forsøk der rognkjeks har blitt smittet med *A. salmonicida* har fisken fått kliniske tegn i form av mørkpigmentering av hud, svullent og blodig gatt og bloduttredelser i hud. Ved obduksjon hadde enkelte fisk granulomer i nyre (Rønneseth et al., 2014).

1.5 Immunsystemet til teleoster

Immunsystemet fungerer som forsvarssystemet til kroppen og er komplekst system som tar hånd om infeksiøse organismer, reparere ødelagte celler og eliminerer avfall (Abbas et al., 2012). Det er trolig flere ulike løsninger med hensyn til oppbygning og respons i immunsystemet mellom ulike fiskearter. Bare innenfor to av våre oppdrettsarter, laks og torsk, er det oppdaget store forskjeller (Star et al., 2011).

Beinfisk har stort sett utviklet de samme immunmekanismene som høyerestående vertebrater, men generelt er immunapparatet mindre spesialisert enn hos pattedyr (Gudding, 2000). Den uspesifikke delen av immunsystemet har derfor større betydning for fisk enn for pattedyr (Saurabh and Sahoo, 2008). En av de viktigste forskjellene er at fisk mangler lymfeknuter og beinmarg (Gudding, 2000). Fisk har lymfoid vev i hodenyre, thymus og milt, i tillegg har de ansamlinger av lymfoide celler i epitel i tarm, gjeller og hud (Press and Evensen, 1999).

Immunsystemet består av en medfødt (uspesifikk) og adaptiv (spesifikk) del, der evnen til hukommelse en er fundamental del av den spesifikke delen. Det går ingen klare grenser mellom den spesifikke og uspesifikke delen, de to ulike systemene samarbeider og er avhengig av hverandre for å kunne fungere (Magnadóttir, 2006).

Det uspesifikke immunsystemet består av fysiske barrierer, en humoral og cellulær del, og er viktig for aktivering av den spesifikke delen (Magnadóttir, 2006). Det gjenkjenner fremmede organismer ved hjelp av pattern recognition receptors (PRR), som er reseptorer som oppdager ukjente strukturer, pathogen assosiated molecular patterns (PAMPs) (Magnadóttir, 2006). Førstelinjeforsvaret skal forhindre mikroorganismer å invadere kroppen ved hjelp av fysiske barrierer som slimlaget, skjell og epidermis. Slimlaget til fisken inneholder flere humorale komponenter, som lektiner, lysozymer, komplementproteiner og antibakterielle peptider (Magnadóttir, 2006). Det er også oppdaget i de senere år at slimlaget til fisk inneholder mucosa assosiert IgT (Zhang et al., 2010). I epitellag i hud, gjeller og tarm er det funnet en

ansamlinger av leukocytter, dette kalles mucosa assosiert lymfoid vev (MALT) (Lazado and Caipang, 2014).

Den humorale delen av det uspesifikke immunsystemet består av løselige forbindelser som man finner i vev og vevsvæsker som skal hemme veksten til mikroorganismer, blant annet transferrin, interferoner, proteasehemmere, lektiner og antimikrobielle peptider (Magnadóttir, 2006, Masso-Silva and Diamond, 2014). I fisk sitt blodserum finnes det naturlige antistoffer som bidrar til en bred beskyttelse mot mikrober. Det er store variasjoner i mengde avhengig av fiskeart og miljøforhold (Uribe et al., 2011). Komplementsystemet består av om ulike proteiner i blodserum som kan ødelegge fremmede organismer ved aktivering av en kaskadereaksjon. Komplementsystemet er også i stand til å aktivere B-celler (Holland and Lambris, 2002).

Immuncellene i det uspesifikke immunforsvaret kan deles inn i fagocytterende celler (monocytter/makrofager og granulocytter) og non-specific cytotoxic cells (Magnadóttir, 2006). Noen fagocytter fungerer som profesjonelle antigenpresenterende celler, disse skiller seg fra andre celler ved å ha MHC II (major histocompatibility complex). Dette er en overflatereseptor som presenterer antigener for T-celler (Reece et al., 2013).

Det spesifikke immunsystemet opparbeider beskyttelse mot ett bestemt patogen, det er denne nøkkelegenskapen som tillater beskyttelse fra vaksinering (Adams, 2016). Det tar lang tid å opparbeide en beskyttende immunitet, opp til flere uker, men når den først er opparbeidet vil reaksjonen være svært effektiv. Lymfocyttene er helt sentrale og er ansvarlig for antigengjenkjennelse, spesifisitet og hukommelse. Disse kan deles inn i B-celler som er ansvarlig for antistoffproduksjon, og T-celler som står for celle-mediert immunitet (Gudding et al., 2014).

Antistoffer aktiverer komplementsystemet og nøytraliserer antigener slik de blir lettere gjenkjennelig for fagocytter (Roberts, 2012). Hos teleoster er det til nå funnet tre klasser av immunoglubliner, IgM, IgD og IgT (Hansen et al., 2005). IgM er spesielt rettet mot systemiske immuniteten, mens IgT ser ut til å ha en spesialisert rolle for immunitet på slimhinner (Zhang et al., 2011).

T-cellene kan inndeles i to funksjonelle grupper avhengig av om de er cytotoksiske- eller hjelperceller. De cytotoksiske T-cellene er direkte involvert i drap av infiserte celler ved å indusere apoptose, målcellen gjenkjennes ved at antigenfragmenter uttrykkes via MHC. T-

hjelperceller har en mer indirekte rolle ved å skille ut cytokiner som igjen aktiverer andre deler av immunsystemet.

B-celler gjenkjenner og aktiveres via B-cellereseptor (BCR). Aktiveringen kan skje direkte ved at et spesifikt antigen binder seg til BCR eller via T-celler, som leder til modning av B-huskeceller og plasmaceller som skiller ut store mengde antistoffer. T-celler gjenkjenner og aktiveres via T-cellereseptor (TCR). Og i motsetning til B-celler er de avhengig av en antigenpresentasjon for TCR levert via MHC (major histocompatibility complex) for å aktiveres (Adams, 2016).

1.5.1 Immunsystemet til rognkjeks

Kunnskap om immunsystemet til rognkjeks er begrenset, men det har i de senere år blitt gjort noe arbeid. Man vet at rognkjeks har et effektivt uspesifikt immunsystem med flere typer leukocytter som har stor kapasitet til fagocytose (Haugland et al., 2012). I tillegg har B-celler blitt isolert og karakterisert, og i analyser av serum har immunglobulinet IgM blitt påvist (Rønneseth et al., 2015). Fra et nylig publisert forsøk ble det demonstrert at rognkjeks har evnen til å danne spesifikke antistoffer gjennom vaksinering mot *A. salmonicida*, det ble også vist gjennom smitteforsøk at vaksinerte grupper en signifikant høyere overlevelse enn uvaksinert grupper (Rønneseth et al., 2017). Det er også nylig blitt påvist MHC II i rognkjeks (Haugland, unpub. data). Disse funnene er en sterk indikator for at rognkjeks har evnen til og utvikle en adaptiv immunitet, og det sannsynligvis er mulig å oppnå en beskyttelse mot *A. salmonicida* gjennom vaksinering.

1.6 Vaksinering av fisk

I dag er vaksinasjon av oppdrettsfisk det viktigste forebyggende enkelttiltaket mot infeksjonssykdommer (Gudding, 2000). Under oppdrett utsettes fisken for forhold som gir godt utgangspunkt for infeksjonssykdom, som høy tetthet, stress og mekaniske skader. På slutten av 80-tallet og begynnelsen av 90-tallet hadde man problemer med kaldtvannsvibriose, klassisk vibriose, furunkulose og vintersår i oppdrett av atlantisk laks i Norge, og det ble brukt store mengder antibiotika. Som et motsvar ble det utviklet effektive vaksiner og man ble mer bevist på hygieneforhold. Miljøbetingelser som påvirker fiskens leveforhold, som hygiene, ernæring, livsstadier, stress, har stor betydning for resultatet av vaksinering. En svekket fisk vil ha lite utbytte av en vaksine.

I dag foreligger det ingen krav om vaksinering av rognkjeks før utsett, men allikevel blir dette utført på majoriteten. Det finnes allerede flere vaksiner på markedet til rensefisk (Tabell **1**), men det arbeides om å forbedre og utvikle disse (Johansen et al., 2016)

Tabell 1: Viser en oversikt over tilgjengelige vaksiner til rensefisk per 2016 (Johansen et al., 2016).

Art	**Administrasjons-metode**	**Leverandør**	**Produktnavn**	**Antigen i vaksinen**
Leppefisk	Stikk	Vaxxinova	Vaxx On Marine 3 vet.	Atypisk *A. salmonicida* (to isolater) og *V. anguillarum* O1
Rognkjeks	Dypp	Vaxxinova	Autogen vaksine mot atypisk *Aeromonas salmonicida* og *Vibrio anguillarum* O1	*V. splendidus*, *V. logei*, *V. ordalii* og *V. anguillarum* O1
	Stikk	Vaxxinova	Vaxx On Marine 3 vet.	Atypisk *A. salmonicida* (to isolater) og *V. anguillarum* O1. Kan inneholde *M. viscosa*
	Dypp	Pharmaq	Alpha Marine Vibrio	*V. anguillarum* O1, O2a og O2b
	Stikk	Pharmaq	AMARINE micro 4-2	*V. anguillarum* O1, O2a og O2b og *A. salmonicida* (to isolat).

For at en vaksine skal være et effektivt hjelpemiddel mot infeksjonssykdommer må den inneholde både relevante antigener og adjuvans. En definisjon på et antigen er et molekyl som kan binde seg til antistoffer eller genererer peptidfragmenter som er gjenkjent av T-celle reseptorer (Murphy and Weaver, 2016). Et antigen er med andre ord noe som har evne til å stimulere og aktivere immunforsvaret. Det finnes flere ulike typer vaksiner kategorisert etter antigentype (inaktivert-, levende-, subenhets- og genteknologiske vaksiner), og en viktig hovedinndeling er om vaksinene inneholder inaktiverte eller levende antigener. Mikroorganismen i inaktiverte vaksiner er drept, gjerne ved hjelp av formalin, slik de ikke er i stand å replisere. En levende vaksine inneholder derimot en levende organisme der de immunogene egenskapene er behold, samtidig som den er svekket i så stor grad at den ikke forårsaker sykdom (Gudding, 2000). I Norge benyttes det ikke levende vaksiner til oppdrettsfisk, dette er først og fremst knyttet til sikkerhet. Det kan være en risiko for at organismen plutselig får tilbake de virulente egenskapene, som kan føre til kraftig infeksjon og spredning av sykdom (Berg et al., 2006).

Effektiviteten til ulike fiskevaksiner varierer, og årsaken kan ha tilknytning til hva det vaksineres mot og immunforsvaret. Vaksiner som har vært mer vanskelig å utvikle med

tilfredsstillende beskyttelse er gjerne mot virussykdommer, som SAV, og intracellulære bakterier, som *Piscirickettsia salmonis*. Dette henger sammen med at antistoffer som skilles ut i en humoral immunrespons ikke vil nå frem til intracellulære organismer. Man er derfor helt avhengig av å frembringe en effektiv cellulær immunrespons, som har vist seg å være mer utfordrende med inaktiverte vaksiner (Murphy and Weaver, 2016). Fordelen med levende vaksiner er at de stimulerer i sterkere grad den cellulære immunresponsen. Dette henger sammen med at infeksjonsforløpet er mer "naturlig", man har en styrt infeksjon som ligner svært mye på den originale infeksjonen. I tillegg vil levende vaksiner i høyere grad gi kryssbeskyttelse (Berg et al., 2006).

I vaksiner mot noen bakterier, som *Vibrio anguillarum* og *Vibrio salmonicida,* er det godt nok med inaktiverte antigener for å oppnå en beskyttende immunitet, for andre bakterier, som *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida,* er ikke dette tilstrekkelig og det kreves i tillegg oljeadjuvans for en beskyttende effekt. Adjuvans er et tilsatt hjelpestoff som benyttes i de fleste injeksjonsvaksiner til både mennesker og dyr, hensikten er å forsterke og forlenge immuniteten etter vaksinering. Adjuvansen fører til en depoteffekt som medfører at antigenene blir eksponert for immunsystemet i en forlenget periode. I tillegg vil adjuvansen medføre en lokal betennelsesreaksjon som rekrutterer immunceller. Det finnes flere ulike typer adjuvans, men i vaksiner til fisk er det vanligvis benyttet oljeadjuvans, dette kan være ulike former av mineral- eller vegetabilske oljer. Adjuvansen kan i tillegg medføre uønskede bieffekter som kan opptre i større eller mindre grad, for eksempel adheranser mellom indre organer eller granulomer ved injeksjonssted. Det er gjerne en forbindelse mellom effekt av vaksinen og graden av bivirkninger, og det er viktig å finne den optimale balansegangen (Gudding, 2000).

1.6.1 Administreringsmetoder for vaksinering av fisk

Vaksiner kan administreres til fisk via forskjellige applikasjonsmetoder. Et viktig hensyn ved administrering er en rasjonell gjennomføring grunnet det høye antallet individer som må behandles. For fisk er de aktuelle administrasjonsmetodene via intraperitoneal injeksjon, immersjon (dypp og bad) og oral tilførsel (Gudding, 2000).

Den vanligste og mest effektive administrasjonsmetoden av vaksine til fisk i Norge er via intraperitoneal injeksjon der vaksineløsningen blir injisert i bukhulen. Fordelen med denne metoden er at hver enkelt fisk blir eksponert for en presis dose vaksineløsning. Ulempen er at

det er arbeidskrevende og fisken blir utsatt for mye håndtering. I dag benyttes vanligvis et profesjonelt vaksineteam som vaksinerer fisken manuelt eller en automatisk vaksinasjonsmaskin (tilbys foreløpig ikke til rensefisk) (Sommerset et al., 2014).

Under immersjonvaksinering eksponeres overflaten av fisken for vaksineløsning der antigenopptaket skjer via gjeller, hud, lateral linje og muligens tarm. Det skilles mellom dypp- og badvaksine etter hvor lenge fisken eksponeres for vaksineløsning. I en dyppvaksine eksponeres fisken i kort tid i en konsentrert vaksineløsning, typisk 30 sekunder til ett minutt. Under badvaksinering eksponeres fisken mye lengre, typisk 30-60 minutter, i en mer fortynnet vaksineløsning (Berg et al., 2006). Vaksineløsningen kan også sprayes på fisken (Gudding et al., 2014).

Under oral applikering tilføres vaksinen via fôret til fisken. Denne metoden blir ansett som den mest ideelle siden håndtering av fisken unngås og den påføres dermed mindre stress. I dag benyttes ikke oral vaksinering i praksis, årsaken er at metoden gir lav beskyttelse samtidig som det kreves et høyt forbruk av antigener (Gudding et al., 2014).

1.7 Evaluering av vaksinebeskyttelse

Vaksiner til fisk må i Norge godkjennes av Statens legemiddelverk for markedsføringstillatelse eller godkjenningsfritak, og i tillegg ha brukstillatelse fra Mattilsynet (Statens Legemiddelverk, SLV). Dokumentasjonskrav er de samme som for andre dyr, og gis på grunnlag av en vurdering av preparatets sikkerhet, kvalitet og effekt (legemiddelloven).

I smittemodeller måles effekten av en vaksine ved å tilføre smittestoff, beskyttet fisk forblir levende mens ubeskyttet fisk dør. Hos mennesker og pattedyr kan ikke vaksineeffekten måles i smittemodeller av etiske grunner. Bad-, kohabitant- og injeksjonssmitte er ulike metoder for å utføre eksperimentell smitte av fisk. I en injeksjonsmittemodell vil samtlige individer bli injisert med smittestoff enten intraperitonealt (i.p.) eller intramuskulært (i.m.) . I en kohabitantsmittemodell vil noen få individer (sheddere) i en gruppe injiseres med smittestoff, disse blir syke og skiller ut smittestoff som resterende individer smittes av. I en badsmittemodell vil samtlige individer eksponeres i et bad med smittestoff under en bestemt tidsperiode.

Fordelen med kohabitant- og badsmitte er at det i mye høyere grad etterligner en naturlig smittevei, og fisken må derfor i høyere grad benytte hele repertoaret av immunmekanismer (Nordmo and Ramstad, 1997). Fordelen med en injeksjonsmittemodell er at den er mer

reproduserbar. Ulempen med en intraperitoneal smittemodell i vaksineforsøk er at smitteveien er unaturlig. Det kan oppstå uspesifikk bukhuleimmunitet, som gjør at det ser ut til som vaksinen gir en bedre beskyttelse enn den faktisk gjør. Dette kommer av at det rekrutteres uspesifikke immunceller etter vaksinering ved stikksted som er tilstede ved injeksjon av smittestoff (Nordmo and Ramstad, 1997).

Det er ikke bare valg av smittemodell som kan påvirke utfallet for et vaksineforsøk, graden av smittepress, virulensegenskaper til agens og miljøbetingelser tilpasset fiskeart er også essensielt. Donald F. Amend foreslo tidlig på 80-tallet noen kriterier for smittemodeller til vaksineforsøk:

- To parallelle oppsett (2 x 25 fisk) med vaksinert- og kontrollgruppe.
- Minst to konsentrasjoner med smitte ved badeksponering.
- Akkumulert dødelighet ≥ 60 % i kontrollgruppe.
- Akkumulert dødelighet ≤ 24 % i vaksinertgruppe.
- Maksimum 10 % ikke-spesifikk dødelighet.

I tillegg utviklet han en statistisk formel, Relative percent survival (RPS), for å beregne den beskyttende effekten fra fiskevaksiner (Amend, 1981):

$$\mathrm{RPS} = 1 - \left[\frac{\%\ \text{vaccinate mortality}}{\%\ \text{control mortality}} \right]$$

Formelen utrykker en ratio for dødelighet i vaksinert grupper sammenlignet med uvaksinerte grupper. Maksimumsverdi er 100 med null dødelighet i vaksinerte grupper, og en verdi på null er det ingen forskjell i dødelighet mellom vaksinert og uvaksinert fisk (Adams, 2016). Mye av Amend sitt arbeid er i dag grunnlaget for standardiserte monografier (Tabell **2**) til vaksineforsøk utviklet av European Pharmacopoeia (Adams, 2016).

For nye oppdrettsarter, som rognkjeks, finnes det ingen standardiserte smittemodeller. Det er derfor behov for å utarbeide standardiserte smittemodeller for vaksineforsøk der isolat, varighet, temperatur og smittepress bestemmes.

Tabell 2: viser Europeiske retningslinjer for effekt, sikkerhet og intensitet i vaksineforsøk. Tabellinformasjon er hentet fra boken Fish Vaccines (Adams, 2016). Per dags dato finnes det ingen retningslinjer/monografier for vaksineforsøk med rognkjeks.

Monografi	Beskrivelse
VICH GL 44	Target animal safety for veterinary live and inactivated vaccines
VICH GL 50	Biologicals: harmonisation of criteria to waive target animal batch safety testing for inactivated vaccines for veterinary use
Ph. Eur 04/2013: 50206	Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera
Ph. Eur 04/2013: 50207	Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera
Ph. Eur. 01/2015: 0062	Vaccines for veterinary use
Ph. Eur. 01/2015: 1521	Furunculosis vaccine (inactivated, oil adjuvanted, injectable) for salmonids
Ph. Eur. 04/2013: 1580	Vibriosis (cold-water) vaccine (inactivated) for salmonids
Ph. Eur. 04/2013: 1581	Vibriosis vaccine (inactivated) for salmonids
Ph. Eur. 04/2013: 1950	Yersiniosis vaccine (inactivated) for salmonids
EMA/CVMP/IWP/582970/2009	Reflection paper on the control of the active substance in the finished product for immunological veterinary medicinal products
EMA/CVMP/IWP/206555/2010	Guideline on the requirements for the production and control of immunological veterinary products
EMA/CVMP/IWP/314550/2010	Guideline on the design of studies to evaluate the safety and efficacy of fish vaccines

I tillegg til eksperimentelle smitteforsøk, benyttes det i dag andre metoder som feltstudier, evaluering av antistoffreaksjoner (ELISA) og påvisning av opp- og nedregulering av cytokiner eller andre immunogener (qRT-PCR) for å dokumentere vaksineindusert beskyttelse (Adams, 2016).

1.8 Oppgavens problemstilling og mål

Høy dødelighet hos rensefisk er i dag et stort velferdsproblem, og bakterielle problemer ser ut til å være en av hovedårsakene. I Veterinærinstituttet sin fiskehelserapport ble *A. salmonicida* rapportert som et av de viktigste sykdomsagenset for rognkjeks (Hjeltnes, 2017). Det er derfor et behov i næringen for beskyttende vaksiner mot *A. salmonicida* til rognkjeks. Samtidig er det behov å undersøke om det er mulig å oppnå beskyttende immunitet så raskt som mulig siden rognkjeks spiser mest lus som små og har en høy veksthastighet på juvenile stadier.

Hovedmålet med forsøket var å utvikle vaksineregime for rognkjeks mot *A. salmonicida* subtype VI, der det ble undersøkt hvor lang tid det tar mellom vaksinering til det er oppnådd beskyttelse. I tillegg ble det undersøkt om det er mulig å få en raskere beskyttelse ved bruk av ulike kombinasjoner av dypp- og stikkvaksinering. Målsetningene med dette prosjektet var:

- Delmål 1: Dokumentere vaksineindusert beskyttelse mot *A. salmonicida* subtype VI i rognkjeks.
- Delmål 2: Opparbeide kunnskap om hvor lang tid det tar mellom vaksinering til det er oppnådd beskyttelse mot *A. salmonicida* subtype VI i rognkjeks, med å utsette vaksinert rognkjeks for intraperitoneal stikksmitte og kohabitantsmitte etter varierende antall døgngrader etter vaksinering (300, 450 og 780 d°C).
- Delmål 3: Undersøke virkning av ulike kombinasjoner av dypp og stikkvaksinering mot *A. salmonicida* subtype VI i rognkjeks, er det mulig å korte ned på tiden det tar for å oppnå en beskyttende immunrespons?
- Delmål 4: Påvise antistoffer og undersøke om det er noen eventuelle forskjeller i respons mellom gruppene basert på ulike kombinasjoner av dypp- og stikkvaksinering.
- Delmål 5: Beskrive makroskopisk og mikroskopisk patologi etter infeksjon med *A. salmonicida* type VI.

2. Material og metode

2.1 Forsøksfisk

I forsøket ble det benyttet oppdrettet rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) fra Marine Harvest anlegg Sighaug i Vanylven kommune. Omtrent 1200 rognkjeks ankom Bergen 29. august med hurtigbåt. Fisken ble videre fraktet til Stiftelsen industrilaboratoriet (ILAB) der fisken umiddelbart ble overført i et forsøkskar med en vanntemperatur på 8 ºC og en størrelse på 500 liter. Rognkjeksen var tilsynelatende kvikk under ankomst, og ingen døde ble registrert post transport. Fisken ble eksponert for lys fra mottagelse og frem til kvelden derpå, deretter hadde den et lysregime på 12 timer mørke og 12 timer lys. Vanntemperaturen ble gradvis justert fra 8 ºC til 10 ºC under en akklimatiseringsperiode på 9 dager. I tillegg fikk rognkjeksen gradvis tilvenning til fôret som ble benyttet ved ILAB. Fôrmengden ble justert underveis, etter appetitt og vekst, med en utfôringsprosent mellom 3,1 – 6,4 justert etter kroppsvekt.

2.1.1 Vannkvalitet og miljøparametere

Salinitet, temperatur og oksygenmetning ble målt av ansatte ved ILAB hver dag. Forsøkskarene hadde sensorer som utløste alarmer utenfor en bestemt grenseverdi (Tabell 3).

Tabell 3: viser oversikt over de ulike vannparameterne under forsøksperioden. Temperatur, salinitet og oksygenmetning ble daglig kontrollert.

Vannparametere for forsøket:	
Temperatur	10 ºC (± 2)
Temperatur under smitteforsøk	15 °C (± 2)
Nedre grenseverdi for oksygen	75-80 % (avhengig av temperatur)
Salinitet	33 ‰ (± 2)
Flow	300-400 L/t (avhengig av størrelse på kar)
Lysregime	Lysregime – 12 : 12
Maksimal tetthet	40 kg/m^3

2.1.2 Oppfølging av forsøksfisk – daglig tilsyn, veiing og registrering av appetitt

Observasjon og oppfølgning av forsøksfisken var en viktig del av forsøket for å fange opp eventuell sykdom, dødelighet eller andre reduserte helsetilstander som kunne påvirke resultatet.

Rutinen hos den friske rognkjeksen var daglig tilsyn for å observere atferd og registrere eventuell dødelighet. I tillegg ble 50 tilfeldige rognkjeks ukentlig veid for å beregne korrekt vaksineringstidspunkt, indentifisere eventuelle vektforskjeller i gruppene og for å kontrollere at biomassen ikke overgår den tillatte grensen per kar.

Forsøksfisken som ble eksponert for smitte fikk også daglig tilsyn for å registrere kliniske tegn og dødelighet. Den ble håndfôret, i tillegg til automatisk fôrautomat, for å registrere appetitten, årsaken til at den smittede rognkjeksen ble håndfôret er for å fange opp så tidlig som mulig en eventuelle tegn til sykdom.

2.2 Pilotforsøk – passering av bakterieisolat og bestemmelse av smittedose

I forkant av smitteforsøkene ble det utført tre pilotforsøk for å sikre virulensen til bakterieisolatet og bestemme konsentrasjon på smittedose. Dette kapittelet er en kort oppsummering av pilotforsøkene som danner grunnlaget for bestemmelse av smittedoser. Benyttede isolater beskrives i kap. 2.5.1 og utførsel av i.p. smitte i kap. 2.6.2.

I pilotforsøk 1.1 ble 12 rognkjeks (ca. 1,5 gram) badsmittet med to ulike konsentrasjoner av *Aeromonas salmonicida* subtype VI isolat Vx1019. Rognkjeksen ble eksponert for smittestoffet i 30 minutter, begge målebegrene ble tilført luft for å sikre oksygennivået. Etter smitte ble temperaturen i løpet av en uke gradvis justert fra 10 til 15°C, dette ble også utført i pilotforsøk 1.2 og 2.1.

I pilotforsøk 1.2 ble 12 rognkjeks smittet med *Aeromonas salmonicida* VI isolat Vx1025. De 6 største rognkjeksene (ca. 8 gram) ble plukket ut til i,p, smitte. De 6 minste (ca. 3 gram) ble badsmittet med en eksponeringstid på 30 minutter, målbegrene ble tilført luft.

I pilotforsøk 2.1 ble 40 rognkjeks (≥ 8 g) i.p. smittet med isolat Vx1025 som var reisolert fra pilotforsøk 1.2 (nedfryste ampuller), de ble smittet med 4 ulike smittedoser. For å skille de fire ulike gruppene med smittedoser fra hverandre ble de merket ved bruk av Visible Implant Elastomer (VIE).

Tabell 4: Viser en oversikt over smittemetode, ønskede smittedoser og faktiske smittedoser basert på cfu fra pilotforsøkene.

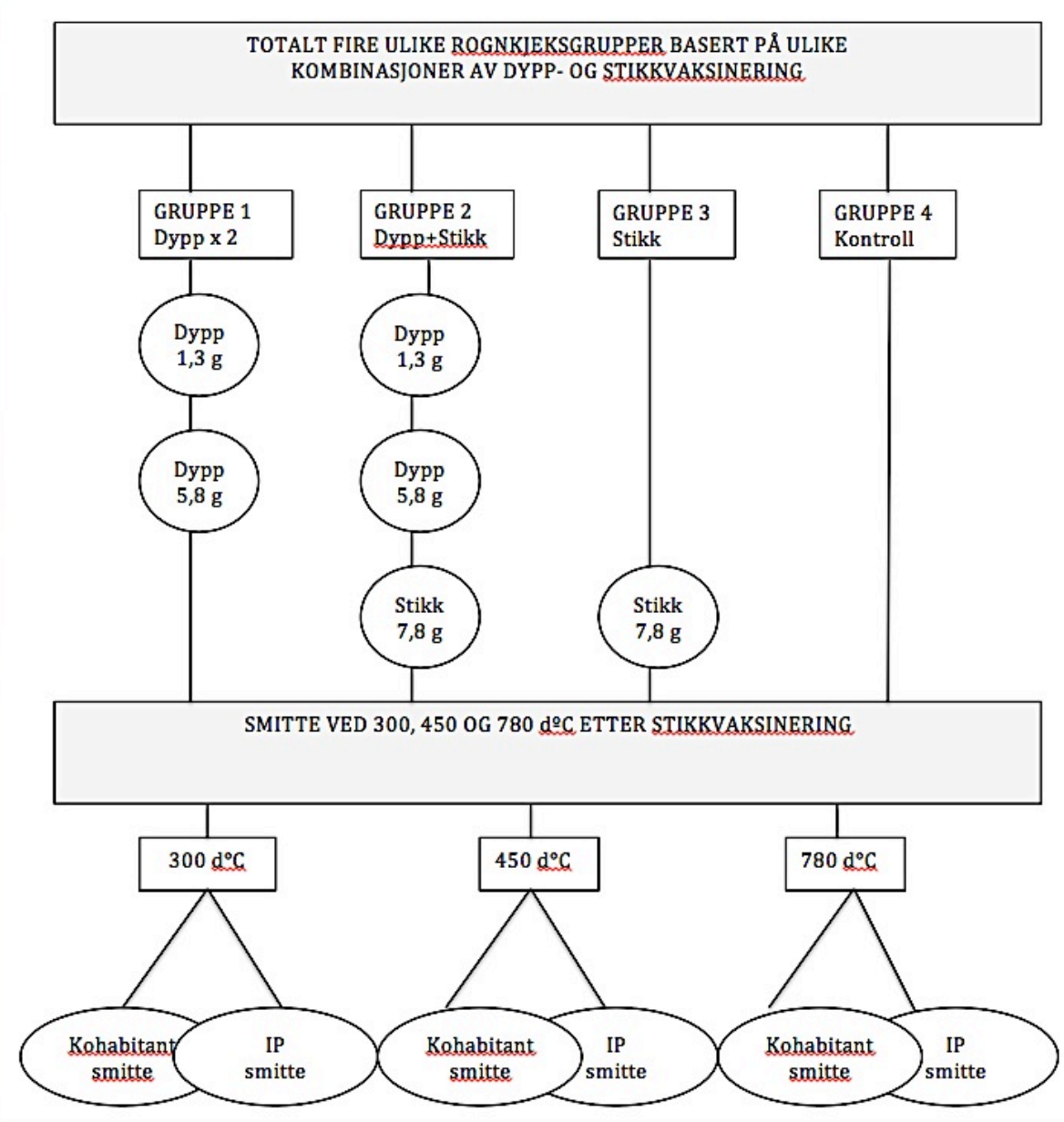
	Smittemetode	Ønsket smittedose	Faktisk smittedose (cfu)
Pilotforsøk 1.1	Bad	5 x 10^8 cfu/ml	1,1 x 10^9 cfu/ml
		5 x 10^7 cfu/ml	1,1 x 10^8 cfu/ml
Pilotforsøk 1.2	Bad	1 x 10^7 cfu/ml	9,5 x 10^6 cfu/ml
		5 x 10^7 cfu/ml	4,8 x 10^7 cfu/ml
	i.p.	5 x 10^5 cfu/dose	4,8 x 10^5 cfu/dose
		5 x 10^6 cfu/dose	4,8 x 10^6 cfu/dose
Pilotforsøk 2.1	i.p.	1 x 10^5 cfu/dose	1,1 x 10^5 cfu/dose
		1 x 10^4 cfu/dose	1,1 x 10^4 cfu/dose
		1 x 10^3 cfu/dose	1,1 x 10^3 cfu/dose
		1 x 10^2 cfu/dose	1,1 x 10^2 cfu/dose

2.3 Forsøksoppsett

Rognkjeksen ble inndelt i fire grupper basert på ulike vaksineregimer:

1. Dyppvaksinert 1 g, dyppvaksinert 5 g
2. Dyppvaksinert 1 g, dyppvaksinert 5 g , stikkvaksinert 8 g
3. Stikkvaksinert 8 g
4. Uvaksinert fisk

Ved 300, 450 og 780 døgngrader etter stikkvaksinering ble fisken smittet med *Aeromonas salmonicida* subtype VI. Det ble benyttet både kohabitantsmitte og intraperitoneal stikksmitte (IP) i separerte kar for hvert av de tre smitteforsøkene. I forkant av smitte ble temperaturen gradvis justert fra 10 til 15 ºC i løpet av 4 dager. De ulike gruppene ble merket med Visual Implant Elastomer (VIE) for å skille de fra hverandre.



Figur 2: Illustrasjonen av forsøksoppsett viser de forskjellige kombinasjonene av dypp- og stikkvaksinering til rognkjeksgruppene. De fire ulike rognkjeksgruppene ble utsatt for smitte etter 300, 450 og 780 døgngrader. Kohabit- og i.p. smitte ble benyttet i alle tre smitteforsøkene.

2.4 Immunisering av rognkjeks

2.4.1 Vaksinesammensetning

I forsøket ble det benyttet dyppvaksine og stikkvaksine beregnet til rognkjeks, begge vaksinene ble laget av Vaxxinova Norway AS.

Dyppvaksine er en formalininaktivert divalent vaksine mot *Aeromonas salmonicida* A-lagstype VI og *V. anguillarum* serotype O1, og har en sammensetning med 1 x 10^9 celler ml^{-1} *Aeromonas salmonicida* subtype VI og ≥ 5 x 10^9 celler ml^{-1} *Vibrio anguillarum* O1.

Stikkvaksine er en formalininaktivert trivalent vaksine med antigenisk innhold av *Aeromonas salmonicida* A-lagstype V, *Aeromonas salmonicida* A-lagstype VI og *Vibrio anguillarum* serotype O1, og har en sammensetning med 7 x 10^7 celler per dose (0,05 ml).

2.4.2 Dyppvaksinering

Det ble utført to gjentagende runder dyppvaksineringer av rognkjeksen fra gruppe 1 og 2 (Tabell 5). I forbindelse med første dyppvaksinering ble det tatt ut 0-prøver til å kontrollere infeksjonsstatus. Etter dyppvaksinering ble uvaksinert og dyppvaksinert rognkjeks holdt i to separate kar med en størrelse på 150 liter ved 10 °C.

Tabell 5: Viser en oversikt over snittvekt og antall rognkjeks som ble dyppvaksinert.

Dato	Snittvekt	Antall
14.09.16	1,3 g	468
27.10.16	5,8 g	464

Selve dyppvaksineringen ble utført ved at et dørslag med rognkjeks rolig ble senket ned i en metallbolle med utblandet vaksineløsning i 30 sekunder (Figur 3). I forbindelse med dyppvaksinering ble rognkjeksen sultet ett døgn i forkant. I etterkant av vaksinering hadde rognkjeksen god overlevelse og vekst.

Figur 3: Dyppvaksinering av rognkjeks ble utført ved hjelp av en metallbolle og et dørslag. Den ble eksponert for vaksineløsningen med et blandingsforhold på 1:9 (v/v) i 30 sekunder.

2.4.3 Intraperitoneal stikkvaksinering, sortering og merking av fisk

Totalt 411 rognkjeks fra gruppe 2 og 3 ble stikkvaksinert med en gjennomsnittsvekt på 7,8 ± 6,3 (SD) gram, den ble sultet ett døgn før vaksineringen. I forbindelse med stikkvaksinering ble rognkjeksen sortert i de ulike gruppene basert på vaksineregime og merket med Visual Implant Elastomer (VIE) (Tabell 6). Rognkjeksen ble bedøvet med Finquel vet. med en dose på 0,167 mg/L under vaksinering og merking. Den ble fordelt i 3 ulike kar, basert på planlagt smittetidspunkt, med en størrelse på 500 liter ved 10 °C. I etterkant av vaksinering og merking hadde rognkjeksen god overlevelse og vekst.

På grunn av store forskjeller i størrelse til rognkjeksen ble de minste fiskene (ca. ≤ 3 gram) sortert ut samme dag siden disse ikke kunne vaksineres. De som var uvaksinert ble plassert i et eget kar på 150 liter, og fungerte senere i forsøket som sheddere i kohabitantsmitte.

Tabell 6: Viser oversikt over VIE-merking av de ulike rognkjeksgruppene basert på vaksineregime. Rognkjeksen ble merket og sortert i forbindelse med stikkvaksinering.

Gruppe	VIE-merking
1. Dypp x 2	To røde striper på hode
2. Dypp x 2 + Stikk	To røde striper på rygg
3. Stikk	To grønne striper på rygg
4. Kontroll	To grønne striper på hode
5. Sheddere	Umerket

Figur 4: Viser merking av rognkjeksen ved hjelp av Visual Implant Elastomer (VIE). Ulike farger (grønn og rød) ble plassert på rygg eller hode for å gjenkjenne de ulike gruppene basert på vaksineregime.

2.5 Bakterieisolater og smittemateriale

2.5.1 Bakterieisolater

Det ble benyttet to ulike isolater av *Aeromonas salmonicida* subtype VI, begge isolert fra rognkjeks i forbindelse med sykdomsutbrudd. Det første isolatet Vx1019 ble isolert fra rognkjeks i Sogn og Fjordane i 2015, dette isolatet ble bare benyttet i pilotforsøk 1.1. Det andre isolatet Vx1025 ble isolert fra rognkjeks i 2013 i Rogaland, dette isolatet ble benyttet i alle resterende smitteforsøk.

NVI-8013 er isolatet av *Aeromonas salonicida* subtype VI som er benyttet i dypp- og stikkvaksine. Dette isolatet er isolert fra sykdomsutbrudd hos berggylt i Møre og Romsdal i 2011. I dette forsøket ble isolatet dyrket opp, inaktivert og benyttet i forbindelse med ELISA.

2.5.2 Bekreftelse av tilstedeværelse av A-laget

Genet som koder for A-laget, *vapA*, er ustabilt og muterer lett, noe som kan gi fravær av A-lag. Dette oppstår gjerne når bakterien passeres i flere omganger i laboratorium eller når den utsettes for høye temperaturer (Ishiguro et al., 1981).

I forbindelse med dyrkning av isolater og bruk av nedfryst smitteinokulum ble *A. salmonicida* dyrket på Coomassie Brilliant Blue (CBB) agar for å bekrefte tilstedeværelsen av A-laget. A-lagspositive (A^+) bakterier vokser som mørkeblå kolonier, mens A-lagsnegative (A^-) bakterier blir hvite, grå eller lyseblå kolonier (Cipriano and Bertolini, 1988).

2.5.3 Smitteinokulum

Aeromonas salmonicida VI isolat Vx1025 ble passert og reisolert i pilotforsøk 1.2 for å sikre virulensen til bakterien. Etter reisolering ble bakterien dyrket opp i 200 ml flytende medium (oppgis ikke av konkurransemessige hensyn) og inkubert i risteinkubator (150 rpm) under 20 ºC, OD600 ble målt underveis for å følge vekstkurven til bakterien. Smitteinokulumet ble deretter tilsatt 20 % sterilt glycerol og frosset ned i ampuller ved -80 ºC. Halvparten av ampullene ble nedkjølt 1 time i kjøleskap i forkant av nedfrysing, årsaken var for å undersøke om bakterien hadde en bedre overlevelse dersom den fikk en gradvis nedkjøling.

2.5.3.1 Seriefortynning og telling av Colony forming units (CFU)

Colony forming units (CFU) er en metode for å estimere antall kolonidannende enheter per milliliter. Både i forkant og etterkant av nedfrysing av smitteinokulum ble bakterietetthet målt ved seriefortynning og påfølgende CFU. Et gjennomsnitt av kimtallet ble grunnlag for å beregne fortynning til de ulike smittedosene. I tillegg ble det tatt CFU i forbindelse med fortynning av smitteinokulum til smitteforsøkene for å estimere den faktiske smittedose.

Det ble laget tre fortynningsserier fra 10^{-1} - 10^{-7} der de ble benyttet 100 mikroliter bakteriesuspensjon og 900 mikroliter 0,9 % Natriumklorid (fysiologisk saltvann). Fra hver av de tre fortynningsseriene ble det spredt 100 mikroliter over på Tryptic Soy Agar (TSA) og Coomassie Brilliant Blue (CBB) fra fortynning 10^{-6} og 10^{-7}. Disse ble inkubert i 20 grader i fem døgn, deretter ble koloniene talt og fargen kontrollert.

2.5.3.2 Turbiditet (Optical density OD)

Turbiditet, målt som OD, er en metode for å måle partikkeltetthet ved hjelp av lysspredning. Bølgelengden varierer ut i fra hva som måles, det ble i dette forsøket benyttet OD600 til måling av bakterier i flytende kultur. Dette ble utført ved å pipettere 1 ml flytende kultur i en kyvette, deretter ble prøvene målt i et spektrofotometer (Eppendorf Biophotometer plus).

2.5.4 Bestemmelse smittedoser

Pilotforsøk 2.1 ga grunnlaget for smittedoser. I dette forsøket ble det gitt fire ulike konsentrasjoner av smittestoff, deretter ble det avgjort smittedose etter den akkumulerte dødeligheten til rognkjeksen.

Kravet for intraperitoneal stikksmitte var at smittedose førte til akkumulerte dødeligheten mellom 60-80 prosent med gradvis oppbygning. Til kohabitantsmitte var det noe usikkerhet om hvilken smittedose og innblandingsforhold av sheddere som måtte benyttes for å etablere dødelighet. Det ble avgjort at innblandingsforholdet av sheddere skulle være 36 prosent og at sheddere skulle få to smittedoser (Tabell 7). Halvparten av sheddere en høyere smittedose og andre halvparten en lavere. Grunnlaget for denne avgjørelsen var at sheddere som fikk den høye dosen ville føre til en akutt høy smitte, mens den andre halvparten en lenger og vedvarende smitte.

Tabell 7: Viser oversikt over ønskede doser for smitteforsøk 300, 450 og 780 døgngrader etter stikkvaksinering. *I smitteforsøk 780 døgngrader etter stikkvaksinering ble det kun gitt en smittedose til sheddere (høy dose).

	Kohabitantsmitte	**Intraperitoneal stikksmitte**
Konsentrasjon smittedose	1 x 10^5 cfu/dose * 1 x 10^4 cfu/dose	1 x 10^4 cfu/dose
Innblandingsforhold	36 % sheddere	

2.6 Smitte av rognkjeks

2.6.1 Karfordeling og antall fisk

Karene som ble benyttet i smitteforsøkene hadde en størrelse på 150 liter (kohab) og 500 liter (i.p.). Tabell 8, 9 og 10 viser oversikt over antall, kar, snittvekt og fordeling av rognkjeks ved oppstart av forsøkene.

Tabell 8: Viser antall rognkjeks fordelt på gruppene, karplassering og snittvekt i smitteforsøk etter 300 døgngrader. Forsøket hadde oppstart 14. desember 2016.

Smitteforsøk 300 dºC	Kar 1 – Kohab smitte	Kar 8 – i.p. smitte	Snittsvekt
Gruppe 1 – Dypp x 2	31	30	12,8 (±9,4) gram
Gruppe 2 – Dypp + Stikk	29	30	
Gruppe 3 – Stikk	30	43	
Gruppe 4 – Kontroll	31	34	
Gruppe 5 – Sheddere	68		

Tabell 9: Viser antall rognkjeks fordelt på gruppene, karplassering og snittvekt i smitteforsøk etter 450 døgngrader. Forsøket hadde oppstart 28. desember 2016.

Smitteforsøk 450 dºC	Kar 2 – Kohab smitte	Kar 7 – i.p. smitte	Snittvekt
Gruppe 1 – Dypp x 2	30	25	20,0 (±13,2) gram
Gruppe 2 – Dypp + Stikk	25	25	
Gruppe 3 – Stikk	31	40	
Gruppe 4 – Kontroll	30	36	
Gruppe 5 – Sheddere	68		

Tabell 10: Viser antall rognkjeks fordelt på gruppene, karplassering og snittvekt i smitteforsøk etter 780 døgngrader. Forsøket hadde oppstart 30. januar 2017 .

Smitteforsøk 780 dºC	Kar 1 – Kohab smitte	Kar 8 – i.p. smitte	Snittvekt
Gruppe 1 – Dypp x 2	22	16	30,3 (± 20,4) gram
Gruppe 2 – Dypp + Stikk	18	22	
Gruppe 3 – Stikk	20	31	
Gruppe 4 – Kontroll	20	34	
Gruppe 5 – Sheddere	45		

2.6.2 Utføring av smitte

Rognkjeksen ble sultet ett døgn i forkant av smitte for å unngå feilstikk. I forbindelse med smitte ble rognkjeksen bedøvd med Finquel vet. med en dose på 0,167 mg/L, rundt fem fisk ble bedøvet omgangen. De ble injisert intraperitonealt med en dose på 0,05 ml fortynnet

smitteinokulum. Plasseringen av stikkpunkt var etter samme anbefalinger som vaksineringsstikkpunkt (i midtlinjen, avgrenses fremover til 1/3 av avstand målt fra bakkant sugekopp til gatt og avgrenses bakover til 1/2 av avstand målt fra bakkant sugekopp til gatt). Det ble benyttet sprøytespisser med ulike lengder (3, 4 og 6 mm) med en bredde på 0,6 mm, tilpasset størrelsen til hvert enkelt individ.

2.7 Registrering av dødelighet

Dødelighet hos forsøksfisken ble daglig kontrollert og registrert, vanligvis både morgen og ettermiddag. Det ble utført humane endpoint av svært syk fisk (svimere). De ble avlivet ved overdose av Finquel vet. og slag mot hode, de ble medregnet i dødelighetsregistrering. Svimere som ble ansett som svært syke lå på bunnen av karet og hadde lite eller ingen reaksjon dersom de ble tatt opp med håv. Døde fisk ble umiddelbart tatt prøver fra eller lagret i fryser til eventuell senere prøvetaking.

2.8 Prøvetaking av forsøksfisk

All prøvetaking av forsøksfisk ble utført i patologilaboratoriet til ILAB. Formålet med prøvetaking var å bekrefte at dødeligheten skyldes *Aeromonas salmonicida*. I hvert av forsøkene ble det tatt bakteriologisk dyrkning fra 45 rognkjeks, totalt 5 fra hver rognkjeksgruppe. I tillegg ble det hentet ut nyreprøver til sanntids RT-PCR og indre organer til histologisnitt.

Under prøvetaking fikk hver rognkjeks sitt eget identitetsnummer der alle tilhørende opplysninger ble lagret under. Dato for død, karnummer, gruppe og hvilke prøver som ble hentet ut ble registrert. Hver fisk ble veid og gransket for eventuelle kliniske tegn både utvendig og innvendig.

Rognkjeksen ble åpnet ved å utføre et transversalt snitt ved hjelp av et sterilt skalpellblad slik at hodenyre ble eksponert til dyrkning på agar og uttak til sanntids RT-PCR. Det ble tatt bakterieprøver fra hodenyre med en steril podeøse (1 µl inoculation loop, Nunc) som ble strøket ut på blodagar (5 % okseblod og 0,9 % NaCl), heretter kalt BA, og blodager med salt (5 % okseblod og 2 % NaCl), heretter kalt BAS. Det ble også dyrket fra sår med en steril podesøse på Marine Agar fra noen få individer (MA). Årsaken til at det ble benyttet flere agartyper var for å kunne oppdage eventuelle andre bakterier.

Vevsprøver fra nyre til sanntids RT-PCR ble lagret i RNAlater og frosset ned ved -18 ºC til senere prøveprosessering.

Prøver til histologisnitt ble hentet fra gjeller, hjerte, lever, nyre, milt og tarm med en størrelse på maks 1 cm^3. Fra de aller minste fiskene ble halve fiske sendt inn fremfor enkeltorganer. Prøvene ble fiksert i bufret formalin med et forhold på 1:10 mellom vev og fikseringsmiddel, og sendt til Veterinærinstituttet i Bergen for prosessering av snitt.

2.9 Bakteriologi

Etter dyrkning fra hodenyre ble BA (20 ºC) og BAS (15 ºC) inkubert i en uke med observasjoner underveis. Små til medium kolonier med hvit, gråhvit, melkehvit eller gulhvit farge var det primære kriteriet for videreføring av kolonier som samsvarer med *A. salmonicida*. Fastheten til kolonier morfologisk konsistent med *A. salmonicida* ble testet ved å skyve kolonien ved hjelp av en podøse (10 µl inoculation loop, Nunc). Dannelse av brunlig pigmentering er et fenotypisk trekk som indikerer *A. salmonicida*. Ved lang inkuberingstid, omtrent en uke, ble det registrert om koloniene dannet pigmentering.

Kolonier med morfologiske trekk i samsvar med *Aeromonas salmonicida* ble dyrket for renkultur på BA til videre fenotypiske bekreftelser. Dersom primærskåler hadde renkultur som oppfylte morfologiske trekk ble det direkte utført fenotypiske undersøkelser av disse.

Katalasetest ble benyttet til å undersøke bakterien sin evne til å produsere enzymet katalase. Ett av kriteriene til *A. salmonicida* er kataseproduksjon. Testen ble utført ved å stryke bakterien på et objektglass og tilføre en dråpe hydrogenperoksid. Ved positivt resultat spaltes hydrogenperoksid til vann og oksygen, som kan observeres som gassbobler på objektglasset.

Oksidasetest ble benyttet til å undersøke om bakterien danner enzymet cytokrom c oksydase. Testen ble utført ved å stryke bakterien på en teststrip (Bactident® oxidase). Ved positivt resultat fungerer reagenset som en elektronakseptor for enzymet, og teststripset får en blå farge.

2.10 Sanntids RT-PCR

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en metode for å amplifisere spesifikke DNA-sekvenser. Sanntids PCR baserer seg på denne metoden, men skiller seg ved at mengden av spesifikke sekvenser blir kvantifisert underveis for hver amplifiseringssyklus. Sanntids PCR typen brukt

i dette forsøket benytter TaqMan prober. Probene er spesifikke for et segment lokalisert mellom de to primerne brukt i reaksjonen. Det er benyttet MGB prober. TaqMan er prober som har et fluorescerende reporter molekyl knyttet til 5´enden og en elektronegativ MGB quencher i 3´enden av proben. Den elektronegative quencheren vil trekke til seg elektron fra reporteren og hindre at denne kan fluorescere. Ved hver vellykket PCR reaksjonssyklus vil Taq-polymerasen brukt i reaksjonen treffe på proben. Taq har en exonuklease som vil spalte proben og frigjøre reporteren. Denne vil da kunne eksiteres og avgi ett lyssignal for hver vellykket amplifisering. Analysen som har blitt benyttet i dette forsøket for å påvise *A. salmonicida* fra vevsprøver er spesifikk for en konservert del av *vapA*. Det er brukt en One-Step revers transkriptase PCR (RT-PCR). Alle PCR-prøver i dette forsøket ble bearbeidet og analysert av Vaxxinova Norway AS i Bergen.

2.10.1 Utførsel sanntids RT-PCR

Totalt 453 vevsprøver, inkludert nullprøver og pilotforsøk, med en størrelse på ca. 10 mg ble overført til et rør med 750 µl Qiazol sammen med en 5 mm stålkule og homogenisert med TissueLyser II (Qiagen) i 2 x 5 minutter med en hastighet på 25 hz. Den homogeniserte løsningen ble oppbevart ved -18 °C frem til rensing. Videre ble det tilsatt 150 µl kloroform, dette ble først ristet i 15 sekunder og deretter inkubert i 2-3 minutter ved romtemperatur. Løsningen ble sentrifugert (Qiagen) med en hastighet på 6000 x g i 15 minutter ved 4 °C, dette førte til en lagdeling av løsningen der det øverste laget rommer RNA. RNA ble videre ekstrahert og renset av RNeasy 96 Universal Tissue med BioRobot Universal System (Qiagen). I reaksjonen ble det benyttet et Quanti Tect one-step RT-PCR kit (Qiagen). 15 µl mastermiks og 5 µl renset RNA ble tilsatt i hvert rør ved hjelp av pipetteringsrobot (Qiagen). Reaksjonsbetingelsene brukt var 50°C i 30 min, 95°C i 15 min. Deretter 40 sykluser med 95°C i 15 sek og 60°C i 60 sek. Amplifiseringsreaksjonene ble gjort med en Rotor Gene® Q (Qiagen).

2.10.2 Primere

Primere benyttet i forsøket var på forhånd designet av Vaxxinova Norway AS. Primere og prober ble bestilt fra Thermofisher Scientific som TaqMan® Gene Expression Assay (Tabell 11). I *A. salmonicida* er målsekvensen en region på 79 basepar av *vapA* som koder for A-laget. LumpElf1a for rognkjeks ble benyttet som elongeringsfaktor (Tabell 11), denne ble

benyttet som en slags kontroll ved jevne og lave Ct-verdier.

Tabell 11: Oversikt over primer- og probesekvenser benyttet i sanntids RT-PCR for påvisning av *A. salmonicida*. LumpElf1a er sekvenser for rognkjeks og fungerer som elongeringsfaktor.

Gen	Sekvens (5´-3´)
A.salm Forward	CGTTGGTGCTTCTATCACTGCTA
A.salm Revers	AACAGCTACTTCACCCTGATTGG
A.salm Probe	CCGTCAGGCTCGC
LumpElf1a Forward	AGCTCGTCCCACCGACAA
LumpElf1a Revers	GACTGTTCCGATACCTCCGATT
LumpElf1a Probe	CCTGCAGGATGTCTAC

2.11 Histologi

Formalinfikserte vevsbiter ble støpt i parafin, snittet og farget med hematoxylin eosin (HE), snittene ble fiksert og prosessert av Veterinærinstituttet i Bergen. Vevsforandringer ble observert og fotografert i mikroskop (Zeiss AXIO Scope A1).

2.12 ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) er en metode for å detektere og kvantifisere tilstedeværelsen av spesifikke antistoffer eller antigener fra en løsning. Metoden fungerer ved at man utnytter affiniteten som et spesifikt antistoff har til tilhørende antigen. Det tilsettes et enzyme koblet sekundært antistoff, konjugat, etterfulgt av substrat som fører til en fargeendring som kan måles ved optisk tetthet (OD) i et spektrofotometer. I dette forsøket var formålet med ELISA å detektere dannelse av antistoffer hos vaksinert rognkjeks, og i tillegg om det var noen forskjeller i de forskjellige gruppene basert på vaksineregime. Det ble utført ELISA to ganger, den første gangen for å bestemme konsentrasjon av rognkjeksserum og kanin-anti-rognkjeks.

2.12.1 Rognkjeksserum

Det ble totalt tatt 40 blodprøver, 10 fra hver gruppe basert vaksineregime, fra rognkjeks 780 døgngrader etter stikkvaksinering. Blodprøvene ble plassert i kjøleskap over natt. Dagen etter ble blodprøvene sentrifugert med en hastighet på 3000 rpm i 10 minutter ved 4 ºC, deretter ble 75 µl rognkjeksserum pipettert fra de 10 individene i samme gruppe (pooled serum) over i 2 ml eppendorfrør og blandet med 50 % glycerol. Prøvene ble lagret ved -20 ºC til videre analysering.

2.12.2 Dyrkning, inaktivering og sonikering av NVI-8013

Det ble laget 200 ml flytende medium (oppgis ikke av konkurransemessige hensyn) som ble tilsatt 950 µl av isolat NVI-8013 (*A. salmonicida* subtype VI) fra nedfrosset ampuller. Dette ble inkubert i en risteinkubator med en hastighet på 150 rpm ved 18 ºC, det ble utført OD600 for å kontrollere veksthastighet. Den flytende kulturen ble inaktivert ved å tilsette 1 ml formalin (0,5 %), rett før inaktivering ble bakterietetthet bestemt ved hjelp av CFU-telling og dyrket på CBB i henhold til tidligere beskrevet metode. Etter inaktivering ble det tilsatt 13 ml flytende kultur i et sterilt falconrør, dette ble sonikert (Fisher Scientific fb120) med en styrke på 50 % under pulseringer på 5 sekunder med en varighet på 1 minutt.

2.12.3 Gjennomføring av ELISA

Det første steget var coating av brønnene, den sonikerte flytende kulturen ble fortynnet i en bikarbonattbuffer til en konsentrasjon på 1 x 10^8 celler per milliliter, basert på verdien fra tidligere CFU-telling. Det ble tilsatt 150 µl av løsningen i brønnene som ble satt i kjøleskap over natten. Neste dag ble brønnene vasket 3 ganger med 300 µl Phosphate Buffered Saline with Tween® 20 (PBST) for å fjerne eventuelle ubundne bakterier. For å blokkere ubundne bindingsseter ble det tilsatt 300 µl PBST + Fetal bovine serum (FBS) i hver brønn med 1 time virkningstid i romtemperatur som deretter ble fjernet, platene ble lagret ved -20 °C til videre prosessering.

Tilsetning av primærantistoff ble utført ved at rognkjeksserumet (pooled serum) fra hver gruppe ble fortynnet i PBST med 2 % FBS, i første kolonne ble det tilsatt 200 µl av det fortynnede fiskeserumet. I resterende brønner ble det tilsatt 100 µl PBST med 2 % FBS, deretter ble fiskeserumet fortynnet bortover langs brønnene i en tofoldsfortynningsserie, dette ble satt i kjøleskap over natten. Deretter ble brønnene vasket 3 ganger med PBST.

I det neste steget ble sekundærantistoff, kanin-anti-rognkjeks, fortynnet med PBST med 2% FBS. I den første ELISA ble det utført en tofoldsfortynning, for å bestemme konsentrasjonen til senere utførsel av ELISA. I den andre ELISA testen ble det benyttet et forhold med 1:3200 kanin-anti-rognkjeks-IgM i alle brønnene. Det ble tilsatt 100 µl i hver brønn som ble inkubert 1 time i romtemperatur, deretter ble brønnene vasket 3 ganger med PBST.

Videre ble conjugate (geit-anti-kanin) tilsatt brønnene fortynnet i PBST med 2 % FBS med en konsentrasjon på 1:4000. Det ble tilsatt 100 µl i hver brønn, dette ble inkubert 1 time i romtemperatur og deretter vasket 3 ganger med PBST.

Så ble det tilsatt 100 µl TMB-ELISA i hver brønn som ble inkubert 20 minutter i romtemperatur, helt til slutt ble det tilsatt 100 µl svovelsyre (H_2SO_4). Resultatet ble avlest med en bølgelengde på OD450 i et spektrofotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek).

2.13 Vannprøver

Formålet med å ta vannprøver var å undersøke om mengden *Aeromonas salmonicida* i forsøkskar endret seg under sykdomsforløpet. Vannprøver ble bare tatt i kohabitantsmitteforsøk 780 døgngrader etter stikkvaksinering. Uttak av vannprøver ble utført hver dag. Det ble tatt ut en liter sjøvann fra samme plass i det aktuelle smittekaret, vannflasken ble rolig senket ned i karet slik at både overflatevann og bunnvann ble tatt inkludert i prøven. Vannprøvene ble vakuumfiltrert gjennom membranfiltre (Schleicher & Schuell Membranfilter 0,45 µ) med et glassfiltreringssystem for filtre med en diameter på 47 mm (Andersen et al., 2010). Filtrene ble så overført til en petriskål og nedfryst ved -18 °C frem til videre analysering. Videre ble 2 av de midtre rutene skjært ut med skalpell (1 rute = 3 x 3 mm). Disse ble homogenisert, renset og kjørt sanntids RT-PCR etter samme metode beskrevet i kapittel 2.9.

2.14 Statistikk

Overlevelse i i.p. smitteforsøkene ble sammenlignet i en Kaplan-Meier analyse med Cox proportional hazard model som gir p-verdier for hver gruppe i forhold til kontrollgruppen. Analysen var statistisk signifikant dersom $p<0,05$. Programvaren som er benyttet til den statistiske analysen er R version 3.3.1 (2016-06-21) (Therneau, 2015, Therneau and Grambsch, 2000).

3. Resultater

3.1 Pilotforsøk – passering av isolat og bestemmelse av smittedose

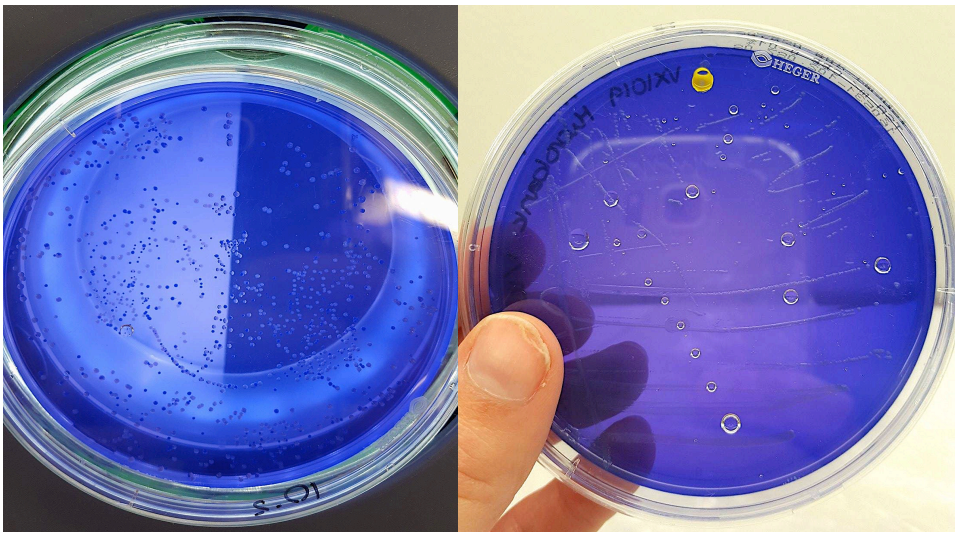
3.1.1 Pilotforsøk 1.1 – Passering av isolat Vx1019

I pilotforsøk 1.1 ble 12 rognkjeksen badsmittet. To døgn etter smitte ble en svimer avlivet og prøvetatt. Svimeren hadde en knekk på halen som trolig var en mekanisk skade. I forsøket var det ingen dødelighet, rognkjeksen hadde god appetitt gjennom hele forsøket og det var heller ingen andre ytre tegn som tydet på sykdom. Forsøket ble derfor avsluttet etter 11 dager. Alle utstryk på BA og BAS var negative for vekst av *A. salmonicida* og det kunne ikke påvises *A. salmonicida* gjennom Sanntids RT-PCR med unntak av ett individ med en CT-verdi på 35,5.

Grunnet fravær av dødelighet og negative prøveresultater ble isolat Vx1019 igjen testet på CBB agar fra nedfryst smittematerial for å kontrollere tilstedeværelse av A-laget. Det vokste opp kun hvite kolonier som tyder på at bakterieisolatet har mistet evnen til å uttrykke A-laget (Figur 5).

3.3.2 Pilotforsøk 1.2 – Passering av isolat Vx1025

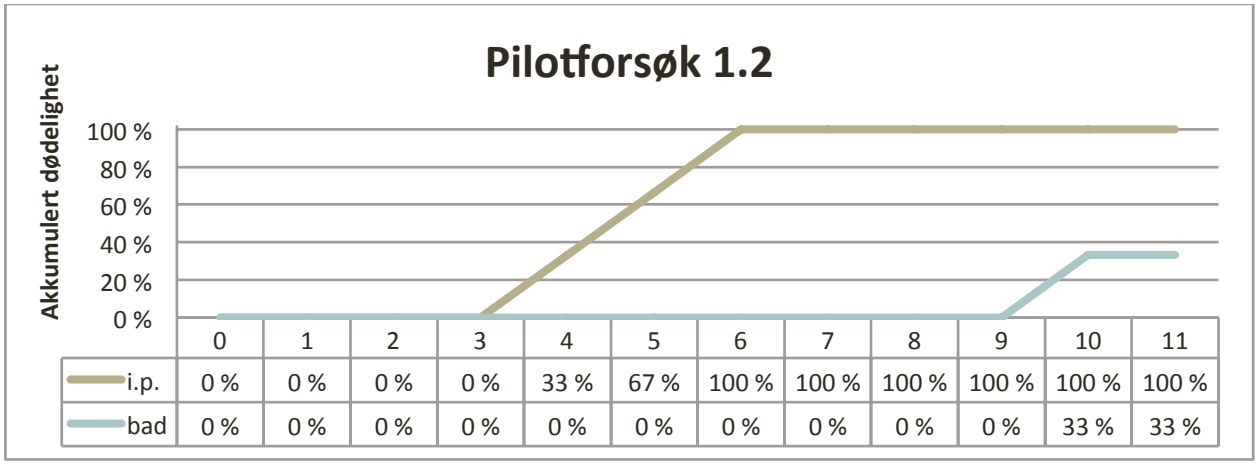
I forkant av pilotforsøk 1.2 ble det dyrket *A. salmonicida* isolat Vx1025 på CBB agar. Det var en tilstedeværelse på 39 prosent av blå kolonier (Figur 5), dette ble tatt hensyn til ved beregning av smittedose til pilotforsøk 1.2 (prosentregning). Etter passering og reisolering fra rognkjeks var samtlige kolonier blå ved dyrkning på CBB.



Figur 5: Bildet til venstre viser *Aeromonas salmonicida* subtype VI (isolat Vx1025) dyrket på Coomassie Brilliant Blue agar. Totalt ble det registrert 132 kolonier med en andel på 39 prosent av blå kolonier. Bildet til høyre viser *Aeromonas salmonicida* subtype VI (isolat Vx1019) som hadde kun hvite kolonier da den ble dyrket på CBB agar, isolat Vx1019 har dermed mistet A-laget (A-).

Alle seks rognkjeksene som ble i.p. smittet med Vx1025 døde fra dag 4 til 6 etter smitte.

Blant de som ble badsmittet ble det registrert en død og en avlivet svimer 9 dager etter smitte (Figur 6). *Aeromonas salmonicida* ble reisolert ved utstryk på BA og BAS fra samtlige av i.p. smittet rognkjeks. Videre ble koloniene dyrket på CBB for å kontrollere A-laget, resultatet var kun mørkeblå kolonier. Det ble isolert *A.salmonicida* fra det døde individet som ble badsmittet, fra resterende badsmittet rognkjeks kunne ikke *A. salmonicida* påvises ved hjelp av nyreutstryk. Det ble tatt sanntids RT-PCR fra samtlige individer, alle i.p. smittede var positive for *A. salmonicida* med CT-verdier under 21. Det var to positive badsmittede individer med CT-verdier over 21, de fire resterende individene var negativ.

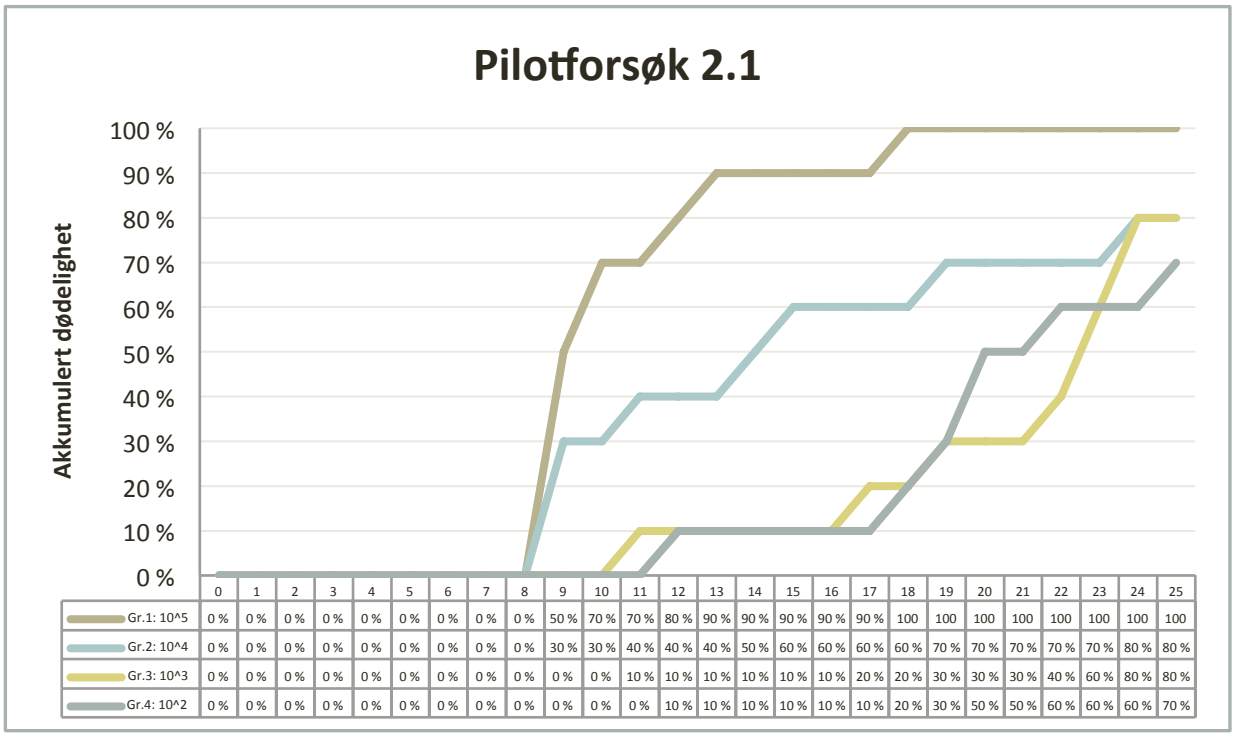


	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
i.p.	0 %	0 %	0 %	0 %	33 %	67 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
bad	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	33 %	33 %

Figur 6: Oversikt over akkumulert dødelighet i pilotforsøk 1.2. Rognkjeksen ble smittet med *A. salmonicida* (isolat Vx1025), bakterien ble passert og reisolert fra fisken for å sikre virulens.

3.3.3 Pilotforsøk 2.1 – Bestemmelse av smittedose (i.p. injeksjonsdose)

Rognkjeksen døde fra dag 8 etter smitte (Figur 7) , alle individer i forsøket ble prøvetatt. *A. salmonicida* ble isolert fra 44 individer ved hjelp av nyreutstryk på BA og BAS. Fem av individene som var negative for vekst av *A.salmonicida* var overlevende fisk ved forsøksavslutning. Det ble også tatt sanntids RT-PCR fra samtlige individer, alle var positive for *A. salmonicida*. Kapittel 2.5.4 beskriver grunnlag for bestemmelser av smittedoser.



	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Gr.1: 10^5	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	50 %	70 %	70 %	80 %	90 %	90 %	90 %	90 %	90 %	100	100	100	100	100	100	100	100
Gr.2: 10^4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	30 %	30 %	40 %	40 %	40 %	50 %	60 %	60 %	60 %	60 %	70 %	70 %	70 %	70 %	70 %	80 %	80 %
Gr.3: 10^3	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	20 %	20 %	30 %	30 %	30 %	40 %	60 %	80 %	80 %
Gr.4: 10^2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	20 %	30 %	50 %	50 %	60 %	60 %	60 %	70 %

Figur 7: Oversikt over akkumulert dødelighet i pilotforsøk 2.1. Fisken ble i.p. smittet med fire ulike smittedoser for å kartlegge effekten og bestemme konsentrasjon til senere forsøk.

3.2 Forsøksfisk

3.2.1 Nullprøver

Det ble tatt ut nullprøver fra totalt 12 individer i forbindelse med første dyppvaksinering. Det kunne ikke påvises *Aeromonas salmonicida* ved bruk av Sanntids RT-PCR og dyrkning fra hodenyre på blodskål. Det var bakterievekst på BA og BAS fra tre individer. Koloniene var store, grågrønne og vibriostatsensitive. Videre biokjemisk kartlegging ble ikke utført siden koloniene ikke var forenlig med *A. salmonicida*.

3.2.2 Forsøksfisk etter dyppvaksinering

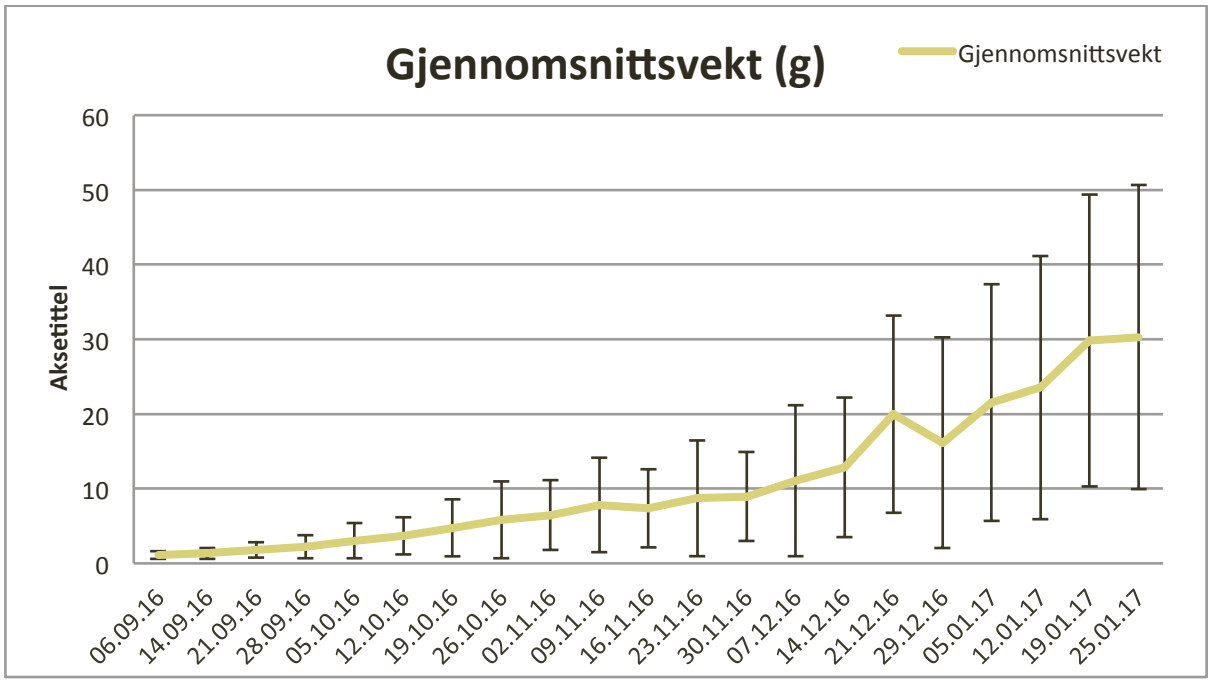
Forsøksfisk hadde tilsynelatende normal atferd og lav dødelighet i forkant av smitteforsøkene. I perioden 14.09.16 – 14.11.16, fra første dyppvaksinering frem til stikkvaksinering, var det en akkumulert dødelighet på 3,3 prosent, i både dyppvaksinert og uvaksinerte gruppe. Rognkjeks som var svimere skilte seg gjerne fra de øvrige individene i gruppen med en passiv atferd der de la seg på siden i bunnen av karet, disse omtales heretter som ”sideliggere”. Sideliggerne var som regel relativt små og hadde i noen tilfeller sår langs haleroten. Fra døde rognkjeks ble det tatt Sanntids RT-PCR, det kunne ikke påvises *Aeromonas salmonicida* fra noen av individene.

3.2.3 Forsøksfisk etter stikkvaksinering

I perioden 15.11.16 – 30.01.17, etter stikkvaksinering frem til smitteforsøk, døde det totalt 2 individer. I gruppen (kar 1) som skulle smittes 300 døgngrader etter vaksinering var det ingen dødelighet. I gruppen (kar 2) som skulle smittes 450 døgngrader etter vaksinering døde 1 fra gruppe 4 (kontroll) som tilsvarer en akkumulert dødelighet på 0,4 %. Og i gruppen (kar 3) som skulle smittes 780 døgngrader etter vaksinering døde 1 fra gruppe 2 (dypp + stikk) som også tilsvarer en akkumulert dødelighet på 0,4 prosent.

3.2.4 Vektmålinger av forsøksfisk

Ved mottagelse av rognkjeksen den 29. august 2016 ble det opplyst om at rognkjeksen hadde en gjennomsnittsvekt på omtrent 0,8 gram. Det var stor spredning i vekt mellom individer (Figur 8).



Figur 8: Viser gjennomsnittsvekt (g) til rognkjeks fra periode 06.09.16-25.01.17. Det var, som standardavvik viser, stor spredning i størrelse mellom individer.

3.3 Smittedoser

Smittedose ble beregnet (Cfu) i forbindelse med fortynning av smitteinokulum i alle smitteforsøk (Tabell 12). I tillegg ble det tatt stryk fra smitteinokulum på CBB for å kontrollere A-lagstatus. Samtlige kolonier som vokste opp var mørkeblå (A^+).

Tabell 12: Oversikt over ønskede smittedoser og faktiske smittedoser basert på seriefortynning og telling (Cfu).

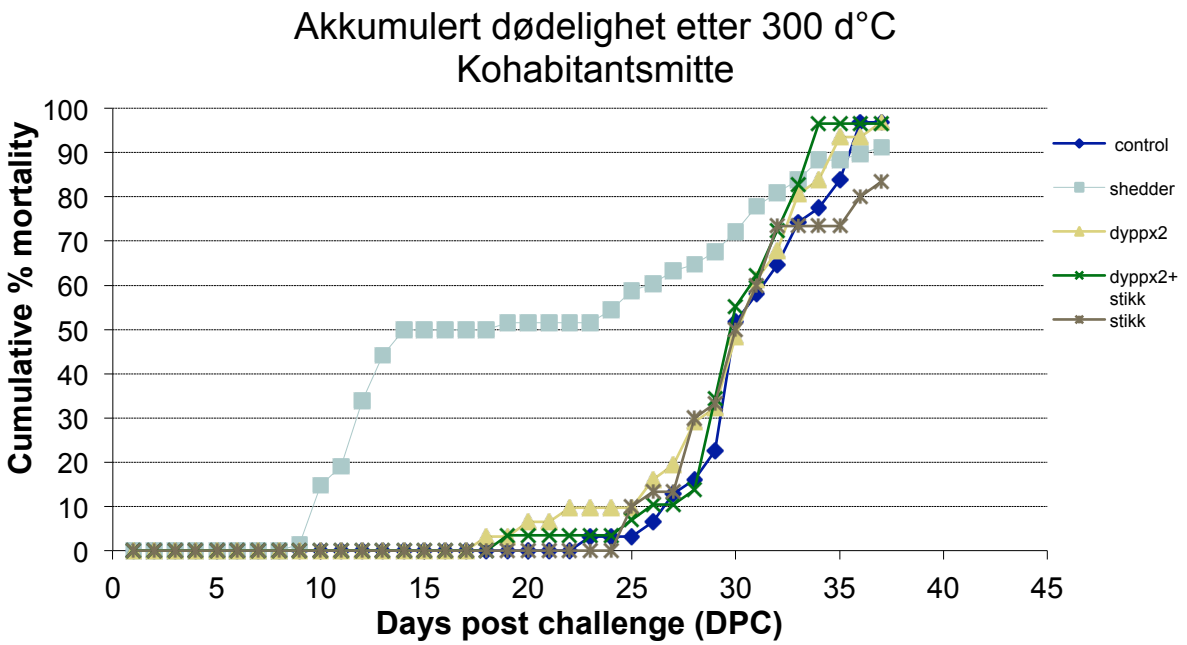
	Smittemetode	Ønsket smittedose	Faktisk smittedose (cfu)
Smitteforsøk 300 d°C	Kohab (sheddere)	1 x 10^4 cfu/dose	7,3 x 10^3 cfu/dose
		1 x 10^5 cfu/dose	7,3 x 10^4 cfu/dose
	IP	1 x 10^4 cfu/dose	7,3 x 10^3 cfu/dose
Smitteforsøk 450 d°C	Kohab (sheddere)	1 x 10^4 cfu/dose	8,4 x 10^3 cfu/dose
		1 x 10^5 cfu/dose	8,4 x 10^4 cfu/dose
	IP	1 x 10^4 cfu/dose	8,4 x 10^3 cfu/dose
Smitteforsøk 780 d°C	Kohab (sheddere)	1 x 10^5 cfu/dose	9,0 x 10^4 cfu/dose
	IP	1 x 10^4 cfu/dose	9,0 x 10^3 cfu/dose

3.4 Dødelighet

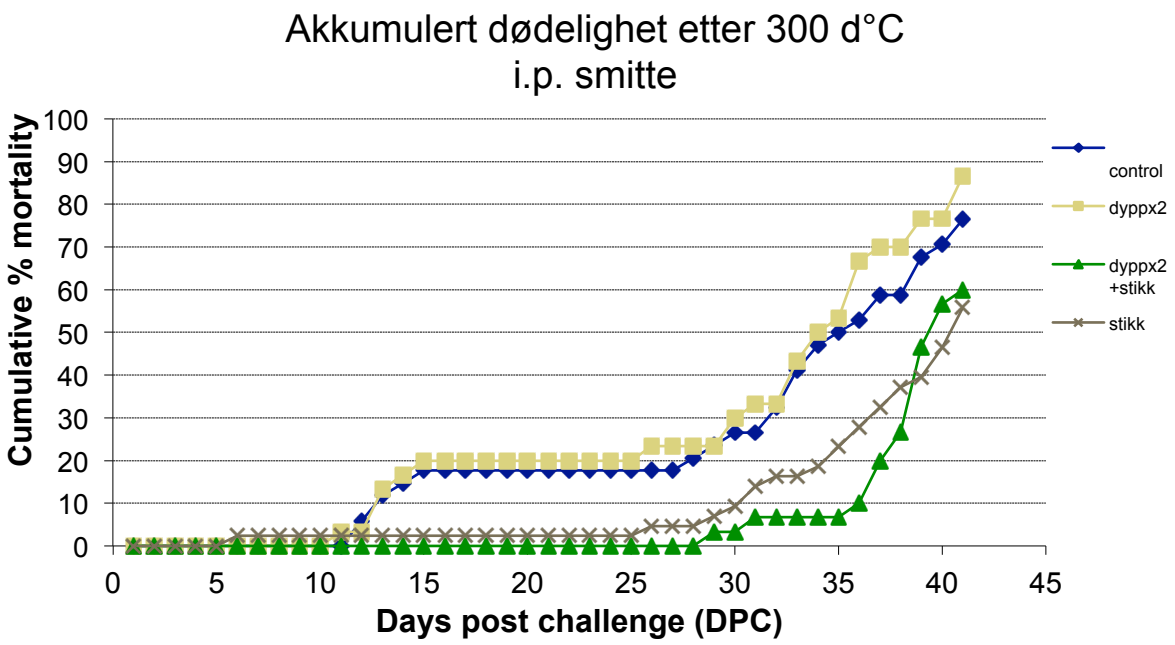
3.4.1 Smitteforsøk 300 d°C etter stikkvaksinering

I kohabitantforsøket startet sheddere å dø fra dag 9 etter smitte og opptrådde svært akutt fra dag 24 i samtlige grupper (Figur 9). Alle gruppene hadde en høy akkumulert dødelighet på over 80 % ved avslutning av forsøket, og det ble ikke observert noe forskjeller i mellom vaksinerte og uvaksinerte grupper.

I forsøket med i.p. smitte var dødeligheten mer gradvis (Figur 10). Gruppe 2 (dypp+stikk) og 3 (stikk) viste noe bedre beskyttelse enn gruppe 1 (dypp) og 4 (kontroll) ved at dødeligheten startet opp senere og at den var lavere ved forsøksslutt.



Figur 9: Diagrammet viser akkumulert dødelighet hos rognkjeksen som ble kohabitantsmittet etter 300 døgngrader. Sheddere fikk to ulike konsentrasjoner av i.p. smitte og hadde et innblandingsforhold på 36 prosent.

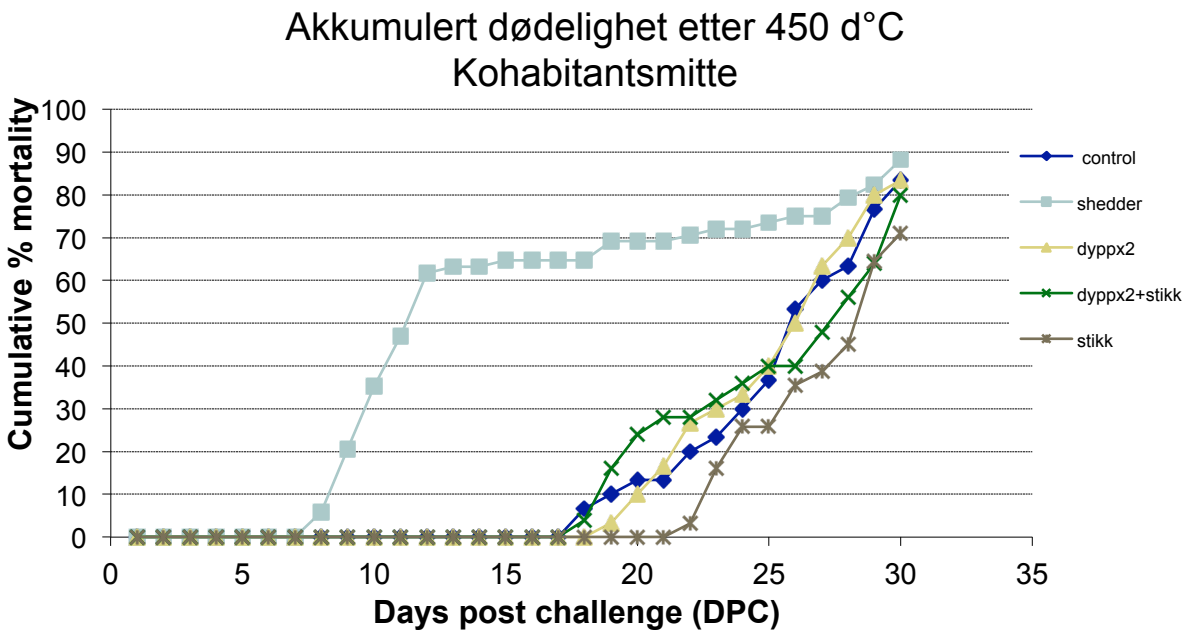


Figur 10: Diagrammet viser akkumulert dødelighet hos rognkjeksen som ble i.p. smittet 300 døgngrader etter stikkvaksinering.

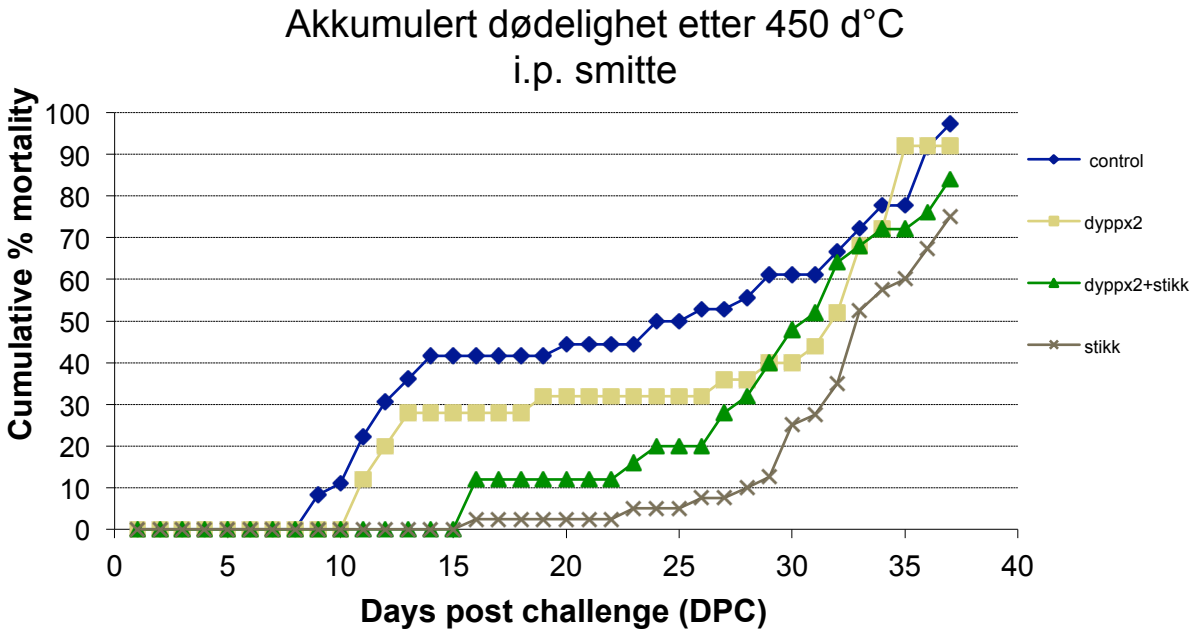
3.4.2 Smitteforsøk 450 d°C etter stikkvaksinering

I kohabitantforsøket 450 d°C startet sheddere å dø fra dag 8 etter smitte og opptrådde akutt fra dag 22 i samtlige grupper (Figur 11). Ved forsøkets endepunkt var det en registrert dødelighet over 70 % i samtlige gruppe, og det ble ikke observert noe forskjeller mellom gruppene med hensyn til vaksineindusert beskyttelse.

I forsøket med i.p. smitte var dødeligheten gradvis (Figur 12). De stikkvaksinerte gruppene viste noe grad av beskyttelse ved at dødelighet startet opp senere. I forsøket var det registrert dødelighet i samtlige grupper 13 dager tidligere sammenlignet med i.p. smitteforsøk 300.



Figur 11: Diagrammet viser akkumulert dødelighet hos rognkjeks som ble kohabitantsmittet 450 døgngrader etter stikkvaksinering.

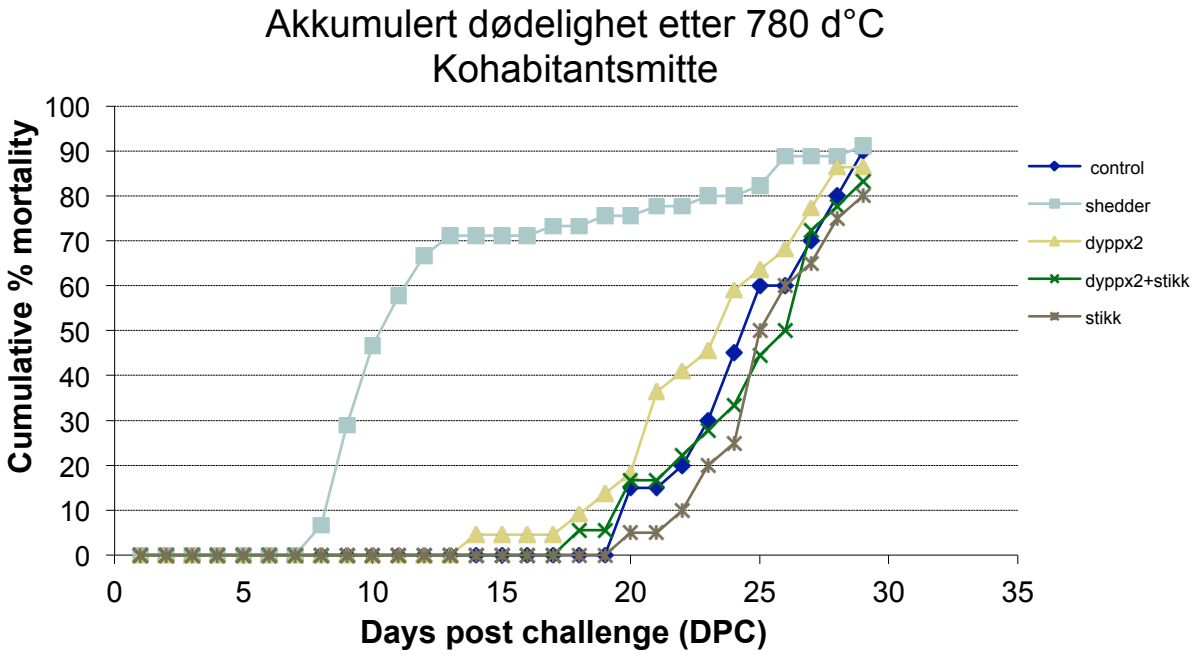


Figur 12: Diagrammet viser den akkumulerte dødeligheten hos rognkjeksen som ble i.p. smittet 450 døgngrader etter stikkvaksinering.

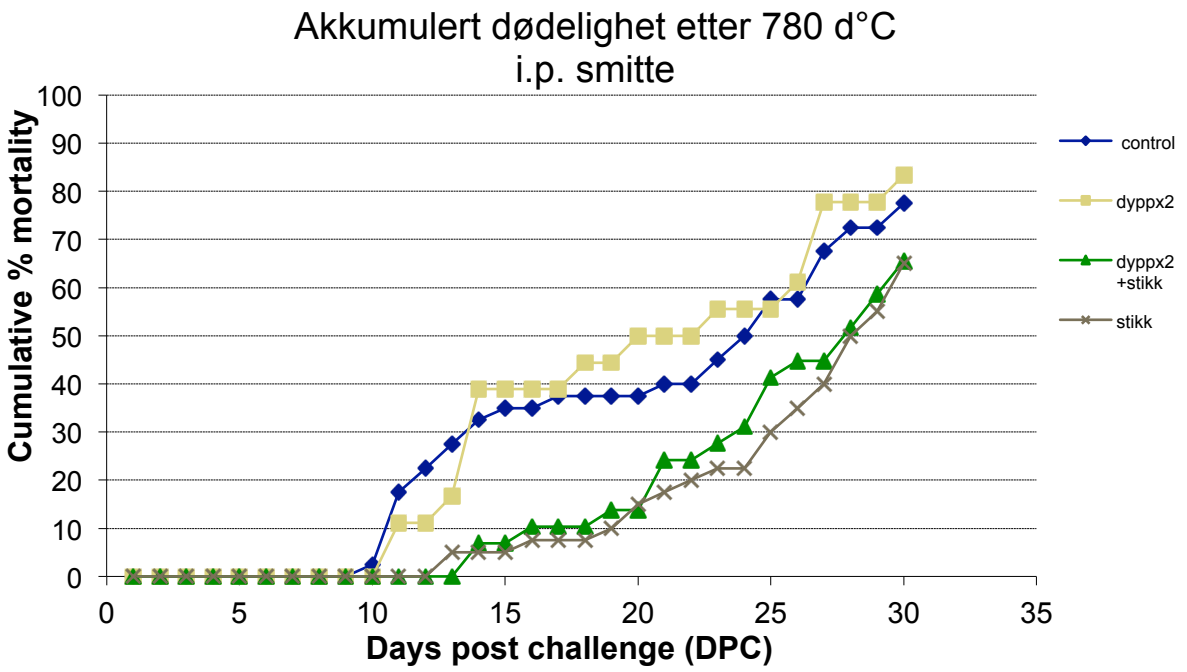
3.4.3 Smitteforsøk 780 d°C etter stikkvaksinering

I kohabitantforsøket startet sheddere å dø fra dag 8 etter smitte og innen dag 20 var det registrert dødelighet i samtlige grupper (Figur 13). Som tidligere kohabitantforsøk opptrådde dødeligheten svært akutt. Ved avslutning var dødeligheten over 80 % i samtlige grupper og det ble ikke observert noe forskjeller mellom grupper med hensyn til vaksinerindusert beskyttelse.

I forsøket med i.p. smitte var dødeligheten gradvis (Figur 14). Som tidligere forsøk viste de stikkvaksinerte gruppene noe bedre beskyttelse. Det var registrert dødelighet i samtlige grupper innen dag 14, 15 dager tidligere enn IP smitteforsøk 300.



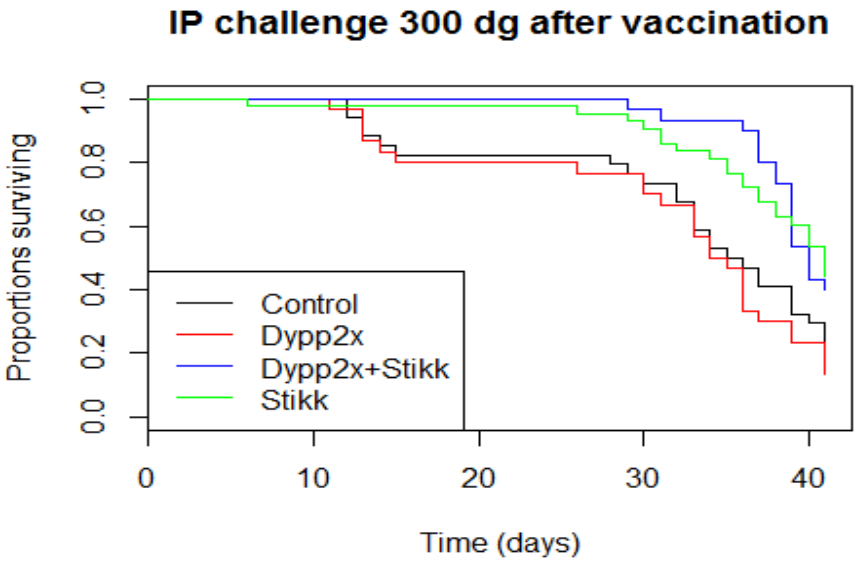
Figur 13: Diagrammet viser akkumulert dødelighet hos rognkjeksen som ble kohabitantsmittet 780 døgngrader etter stikkvaksinering. Sheddere fikk i dette forsøket bare en smittedose (høy dose).



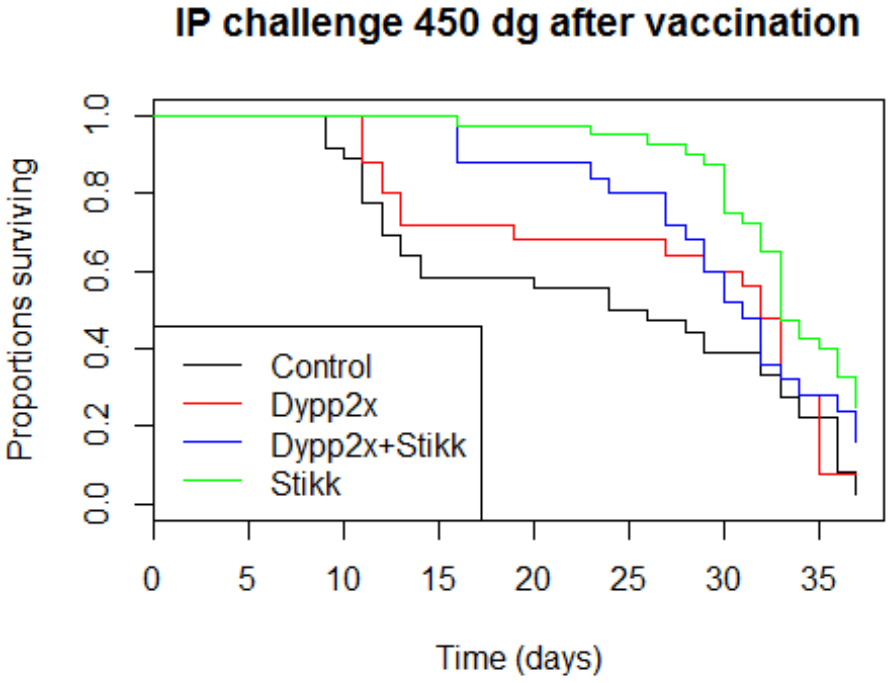
Figur 14: Diagrammet viser akkumulerte dødelighet hos rognkjeksen som ble i.p. smittet 780 døgngrader etter stikkvaksinering.

3.5 Overlevelsesanalyse – Kaplan Meier

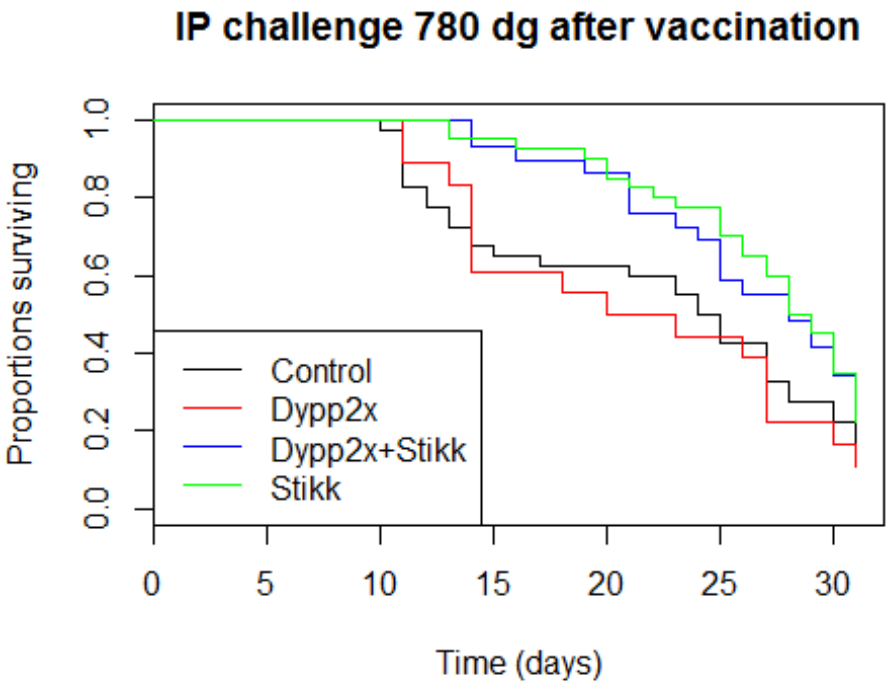
RPSverdier, ”Mean time to death” verdier, og statistisk sammenligning mellom grupper (p-verdier fra Cox proportional hazard model) for i.p. smitteforsøkene er oppsummert i tabell 13, 14 og 15.”Mean time to death” fra Kaplan Meier analysen viser, akkurat som dødelighetskurver, en forskyvning i tid for observert dødelighet. Kaplan Meier analysen er vist i figur 15, 16 og 17.



Figur 15: Diagram for overlevelsesanalyse (Kaplan-Meier) i i.p. smitte 300 døgngrader.



Figur 16: Diagram for overlevelsesanalyse (Kaplan-Meier) i i.p. smitte 450 døgngrader.



Figur 17: Diagram for overlevelsesanalyse (Kaplan-Meier) i i.p. smitte 780 døgngrader.

Tabell 13: Oversikt over mean time to death (mean), RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet fra i.p smitteforsøk 300. I Kaplan-Meier analysen er mean statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen hvis p< 0.05.

300 d°C	mean	P verdi Cox	RPS60	RPSend	Cu.mort
Kontroll	32,6				76,5 %
Dypp	31,5	0.343	-18,1 %	-13,3 %	87 %
Dypp + Stikk	39,0	0.031	51,1 %	21,5 %	60 %
Stikk	37,5	0.018	37,5 %	27,0 %	55,8 %

Tabell 14: Oversikt over mean time to death (mean), RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet fra i.p. smitteforsøk 450. I Kaplan-Meier analysen er mean statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen hvis p< 0.05.

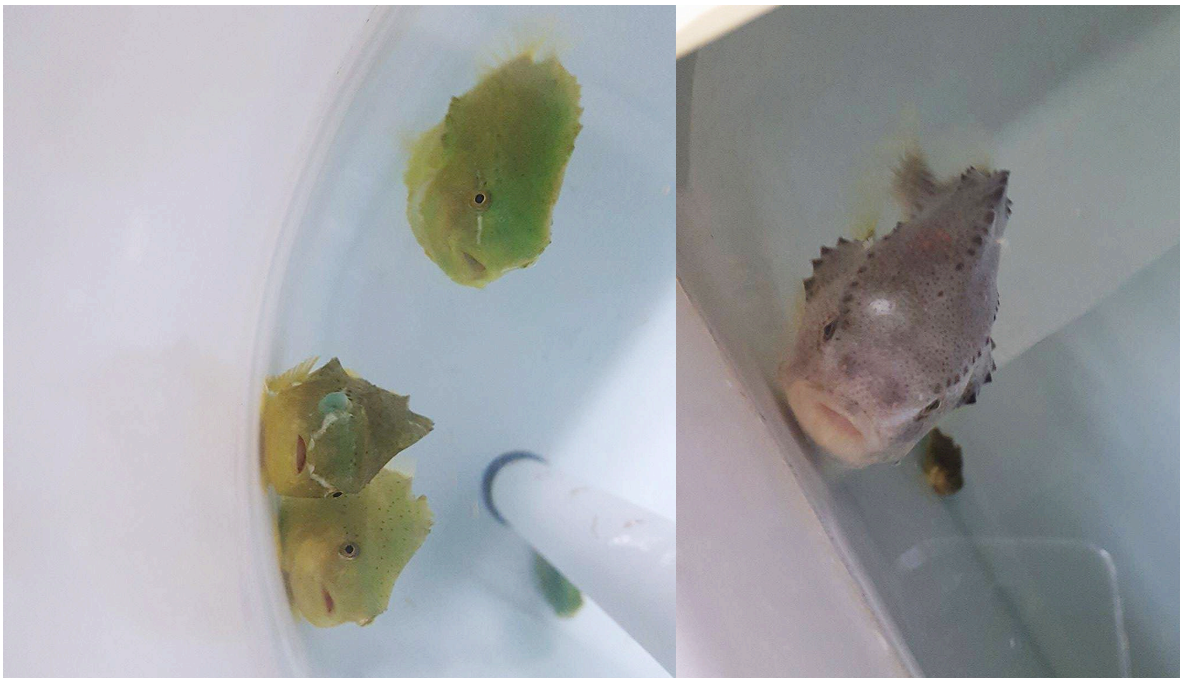
450 dºC	mean	p verdi Cox	RPS60	RPSend	Cu.mort
Kontroll	23,3				97,2 %
Dypp	26,7	0.391	34,7 %	5,4 %	92 %
Dypp + Stikk	29,9	0.0909	36,0 %	13,6 %	84 %
Stikk	33,0	0.0005	80,0 %	22,9 %	75 %

Tabell 15: Oversikt over mean time to death (mean), RPS60, RPSend og akkumulert dødelighet fra i.p. smitteforsøk 780. I Kaplan-Meier analysen er mean statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen hvis p< 0.05.

780 dºC	mean	p-verdi Cox	RPS60	RPSend	Cu.mort.
Kontroll	22,0				85 %
Dypp	21,2	0.615	-8,8 %	-4,6 %	89 %
Dypp + Stikk	26,1	0.108	25,3	10,8 %	76 %
Stikk	26,8	0.057	39,6	8,8 %	77,5 %

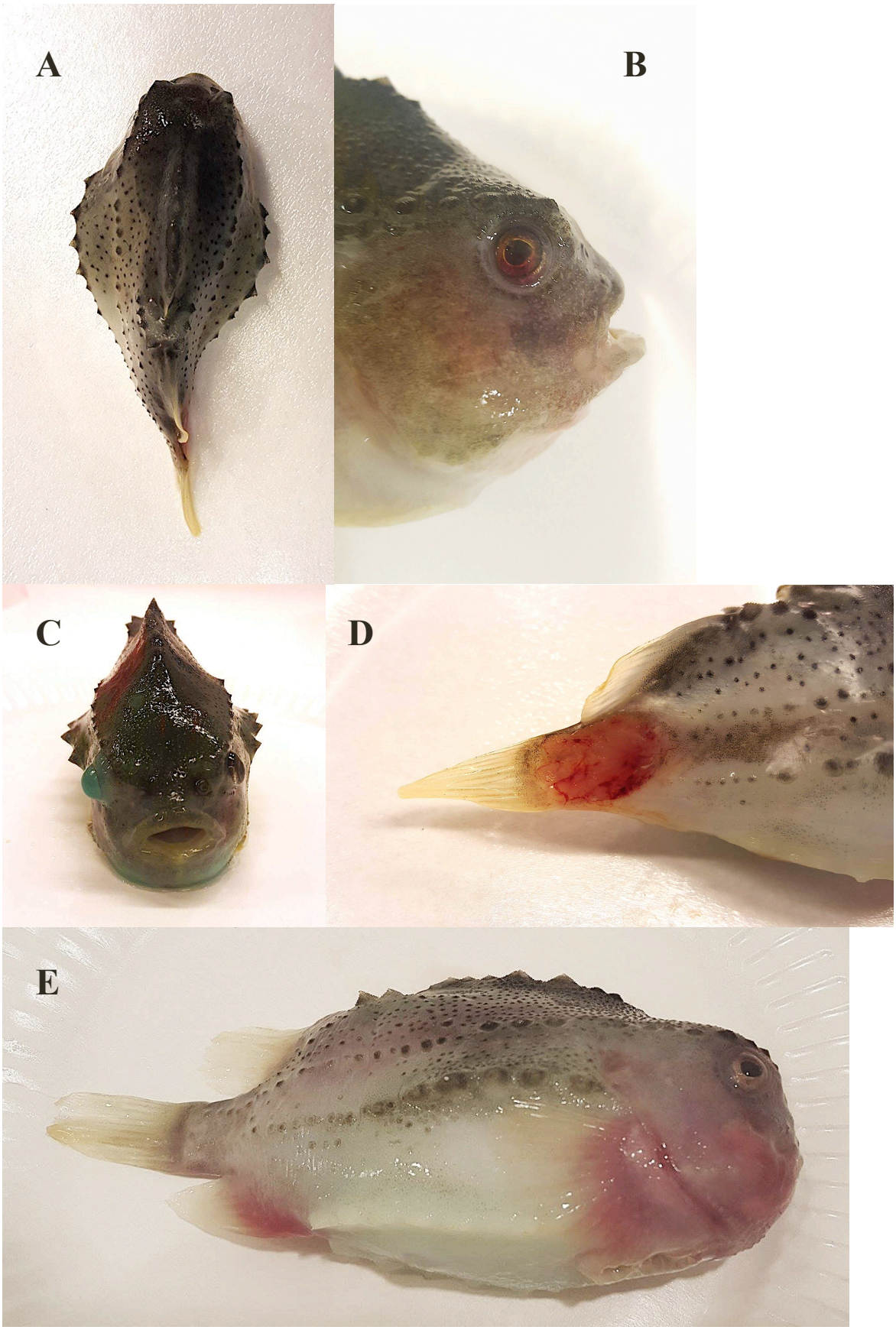
3.6 Klinikk

I løpet av forsøksperioden ble rognkjeksen observert daglig og det ble dannet et inntrykk av normalatferd. Syk, eller svært syk, rognkjeks skilte seg gjerne ut med en stor oppsvulmet buk og svimete atferd der den lå på bunnen av karet eller ble tatt av vannstrømmen. Etter slike synlige kliniske tegn dukket opp gikk sykdomsforløpet raskt, og rognkjeksen døde gjerne innen få timer. Rognkjeksen hadde stort sett god appetitt gjennom hele forsøksperioden, også den syke fisken. Noe av den syke rognkjeksen utviklet sår og/eller utspilte og væskefylte øyne, dette dukket typisk opp litt senere i forsøksperioden (Figur 18).



Figur 18: Viser bilder av kliniske tegn som ble observert på syk fisk. Bildet til venstre viser en rognkjeks som har et oppsvulmet og væskefylt øye. På bildet til høyre har rognkjeksen fått et hvitt sår over ene øyet. Begge disse kliniske tegnene var nokså vanlig i forsøket og opptrådde gjerne en stund etter smitte.

I forbindelse med prøvetaking ble fisken studert utvendig og obdusert. En oppsvulmet og rund buk hos den syke fisken var en vanlig observasjon, i noen tilfeller var fisken så oppsvulmet at gattet også svulmet ut, gjerne med bloduttredelser. Bloduttredelser i hud opptrede hos noe av rognkjeksen, oftest i hake- og haleregion, men også langs finner. Utvikling av sår opptrådde gjerne senere i sykdomsforløpet, ca. 20 dager etter smitte, i starten dukket det gjerne opp mindre hvite sår som etter hvert kunne utvikle seg til større runde sår. Øynene til rognkjeksen ble i mange tilfeller påvirket av øyeblødninger, exopthalmia eller at de var utspilte og væskefylte (Figur 19).



Figur 19: Et utvalg av ytre kliniske tegn som opptrede underveis i smitteforsøkene. På bilde A) Kraftig utspilt buk B) Øyeblødning C) Utspilt og væskefylt øye D) Sår E) Bloduttredelser.

Under obduksjon av rognkjeksen var de vanligste funnene acites og blødninger i nyre og lever (Figur 20). Det var variasjoner i graden av blødninger innvendig, i verre tilfeller kunne det observeres blødninger langs hele magetarmsystemet i tillegg til lever og nyre. Fargen på indre organer var noe varierende, i noen tilfeller var de bleke og andre tilfeller mørke, men i flest tilfeller hadde de en tilsynelatende normal farge. Fargen på leveren varierte mye, fra kraftig sennepsgul til en mer blek gultone. I mer sjeldne tilfeller ble det observert granulomer i nyre eller milt. Majoriteten av rognkjeksen som ble prøvetatt hadde fôr i magetarmsystem.

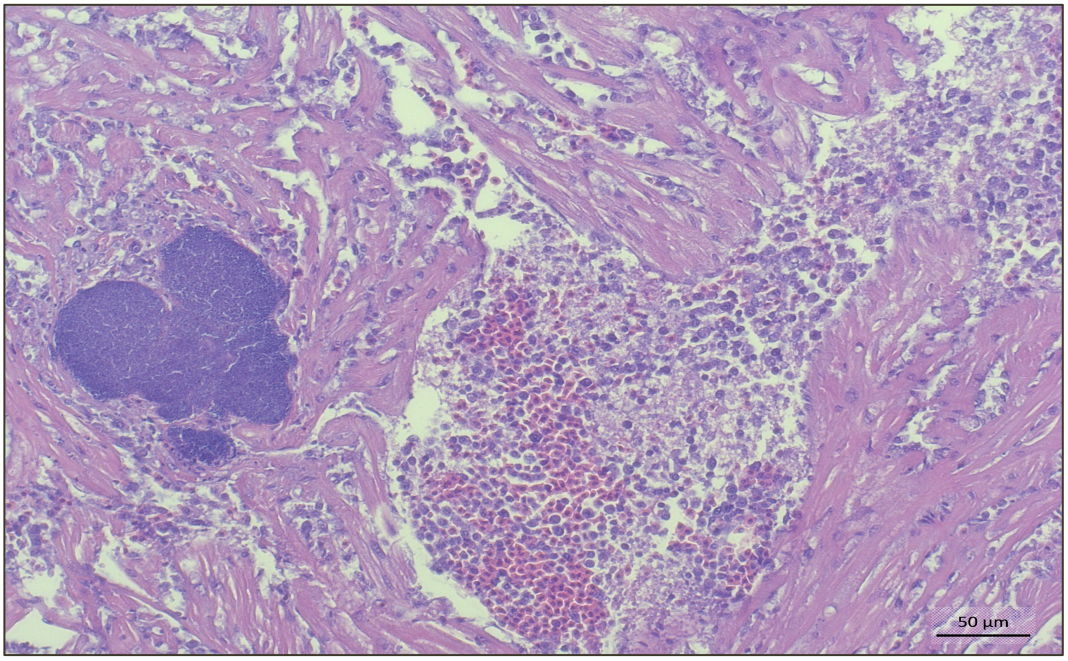
Figur 20: Typisk indre bilde med små punktblødninger i lever og nyre.

3.7 Histopatologi

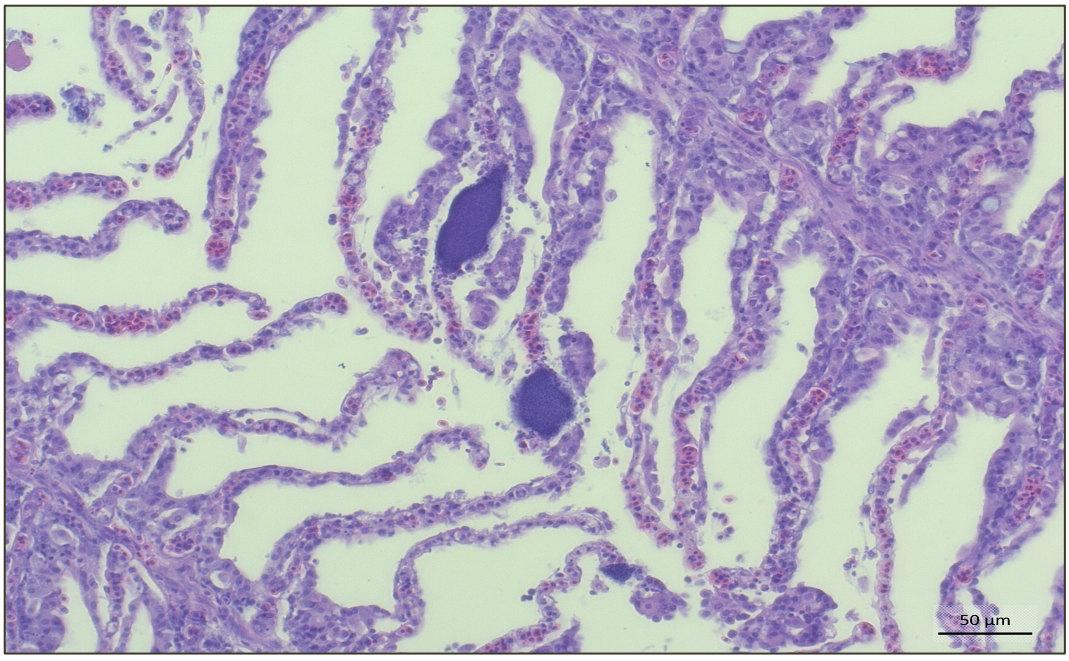
3.7.1 Histopatologiske forandringer knyttet til *Aeromonas salmonicida*

Det ble observert histopatologiske vevsendringer forenlig med *A. salmonicida* i 7 av 12 dødfisk. Det ble registrert forekomster av mikrokolonier i flere organer (nyre, gjeller, hjerte, milt og lever) som tyder på sepsis. I nyre ble det typisk observert nekrose og blødninger. Det ble i færre tilfeller observert antydning til granulomdannelse med bindevev og infiltrasjon av betennelsesceller, som tyder på at sykdomsforløpet har vært perakutt/akutt. Hjerte (Figur 21) og milt var typiske observasjoner nekrotisk vev, blødninger og infiltrasjon av

betennelsesceller . Det ble i sjeldnere tilfeller observert mikrokolonier og vevsforandringer knyttet til *A. salmonicida* i lever enn de andre nevnte organer. I gjeller (Figur 22) var det ofte observert hyperplasi og blødninger mellom lameller. Det ble i tillegg hentet ut prøve fra 7 overlevende fisk, det ble ikke observert vevsforandringer knyttet til *A. salmonicida* i disse.



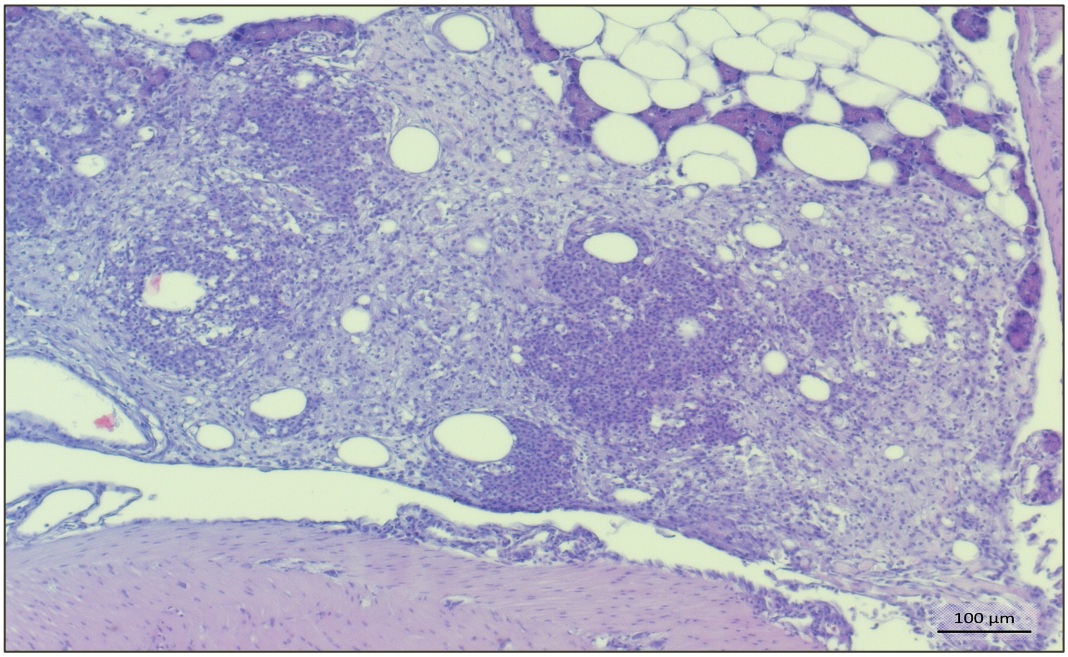
Figur 21: Hjertemuskulatur farget med HE, bildet viser en mikrokoloni av *A. salmonicida*, infiltrasjon av betennelsesceller og degenerasjon og nekrose av muskelfibre.



Figur 22: Gjeller farget med HE, bildet viser flere mikrokolonier av *A. salmonicida*, blødninger og hyperplasi.

3.7.2 Peritonitt – Bieffekter fra vaksinering

Det ble observert peritonitt i 8 av totalt 19 individer, 6 av disse var stikkvaksinert. Det ble typisk observert høy infiltrasjon av betennelsesceller. I noen tilfeller ble det observert granulomatøs peritonitt med bindevevslesjoner, nekrotisert vev og vaksinerester (Figur 23).

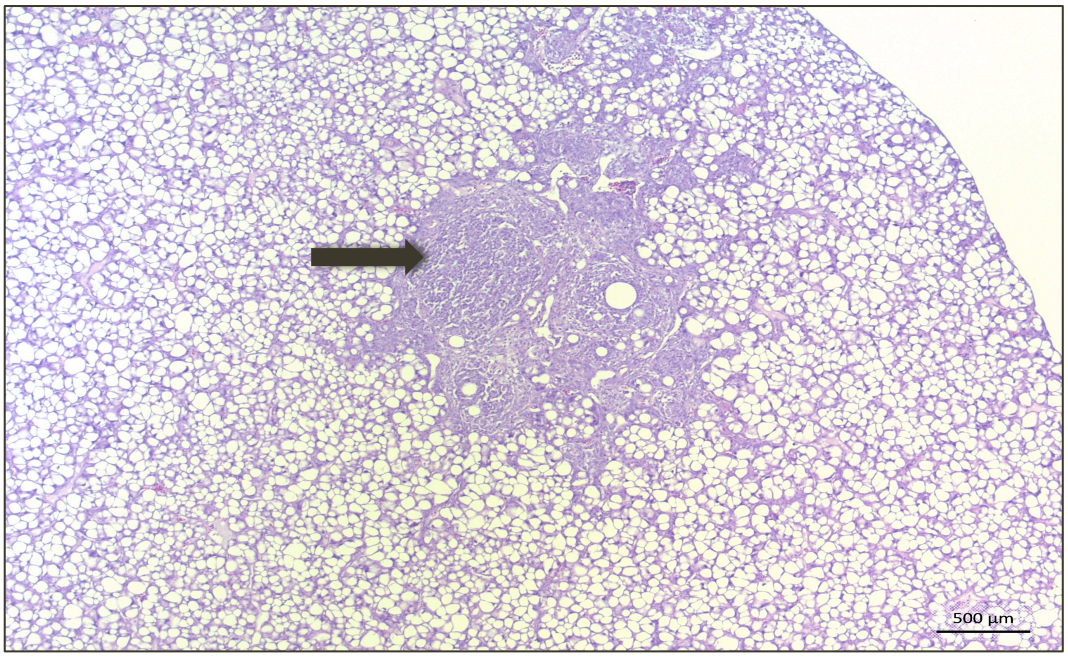


Figur 23: Eksokrint og endokrint pankreasvev farget med HE, bildet viser granulomatøs peritonitt, trolig en bieffekt fra vaksinering.

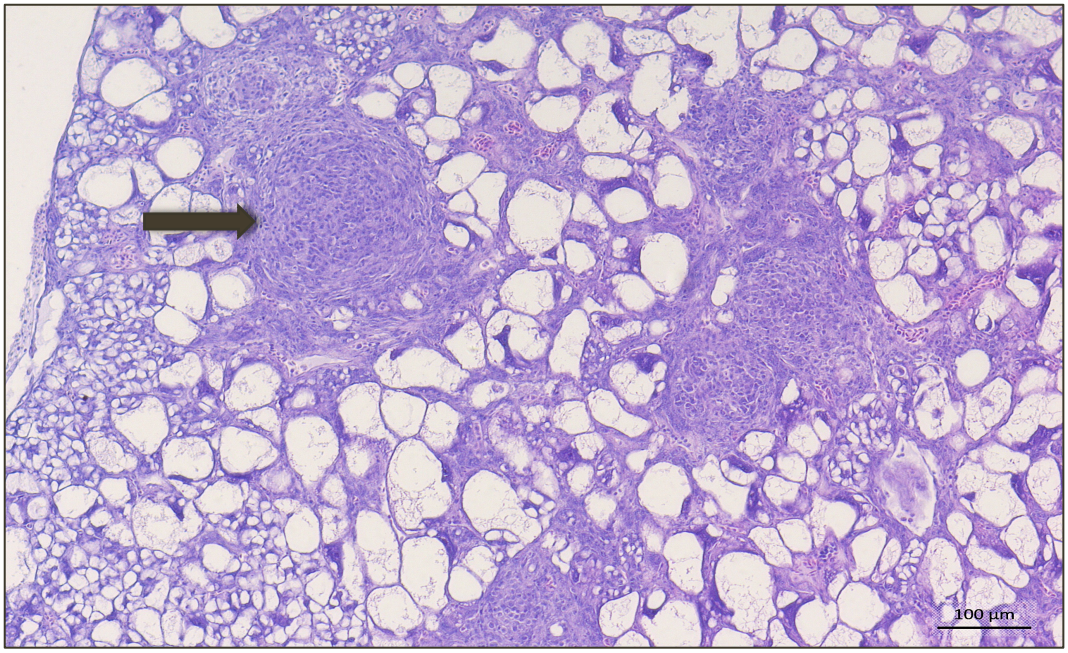
3.7.3 Andre histopatologiske funn

Det ble observert degenerasjon og nekrose i muskelfibre i noen individer, samtlige av individene var sheddere. Det ble også observert brunlige ansamlinger av noe ukjent i milt hos noen individer.

I majoriteten av individene ble det observert noe som minner om store ansamlinger av betennelsesceller i lever. Graden av hvor affisert leveren var varierte, i noen tilfeller få fokale ansamlinger av betennelsesceller omringet normale hepatocytter (Figur 24). I andre tilfeller kunne det nesten ikke observeres normalt vev, men fullstendig infiltrasjon av betennelsesceller, nekrotisk vev, blødninger og granulomdannelse (Figur 25).



Figur 24: Levervev farget med HE, bildet viser en ansamling av betennelsesceller omkranset av tilsynelatende normale hepatocytter.



Figur 25: Levervev farget med HE, bildet viser et sterkt affisert individ med betennelsesceller og startende granulomdannelse, nekrotisk vev og blødning.

3.8 Bakteriologi

Det ble tatt nyreutstryk fra totalt 135 rognkjeks på BA og BAS for å påvise *A. salmonicida* og eventuelle andre bakterietyper. Etter dyrkning fra hodenyre ble BA (20 ºC) og BAS (15 ºC)

inkubert i en uke med observasjoner underveis. Kolonier morfologisk konsistent med *A. salmonicida* (Figur 26) ble videre katalase- og oksidasetestet, samtlige var positive.

Tabell 16: Andel individer som var positive for vekst av *A.salmonicida* ved nyreutstryk på BA og BAS.

	Positive for vekst av *A. salmonicida*
Smitteforsøk 300 d°C	50 %
Smitteforsøk 450 d°C	69 %
Smitteforsøk 780 d°C	68 %

Figur 26: Bildet viser vekst av *A.salmonicida* på BA fra nyreutstryk.

3.8.1 Andre bakteriologiske funn

I noen tilfeller vokste det opp andre bakterier enn *A. salmonicida* fra nyreutstryk på BA og BAS. Den hyppigst forekommende varianten var store betahemolytiske grågrønne kolonier (Figur 27). I ett tilfelle ble det utført vibriostattest av denne morfologiske varianten, resultatet var positivt. Det ble ikke utført videre biokjemisk testing for artsbestemmelse, men kolonimorfologi er konsistent med *Vibrio splendidus* (Colquhoun & Vågnes, pers. comm). Det ble også tatt utstryk fra sår på MA fra 6 individer, for å undersøke om det var en

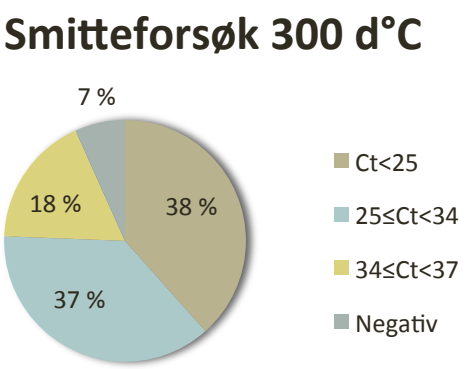
tilstedeværelse av *Tenacibaculum maritimum*, resultatet var en blandingsflora av *A. salmonicida* og flere uidentifiserte miljøbakterier (Vågnes, pers. comm).

Figur 27: I noen tilfeller vokste det store betahemolytiske kolonier med en grågrønn farge morfologisk forenlig med *Vibrio splendidus*.

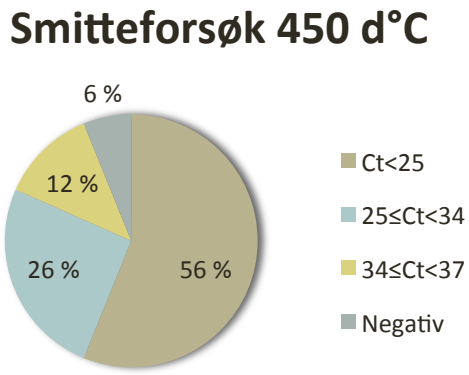
3.9 Sanntids RT-PCR

Det ble tatt nyreprøver fra totalt 342 rognkjeks for å påvise *A. salmonicida* ved hjelp av Sanntids RT-PCR. Ct-verdiene ble kategorisert inn i høy (Ct<25), middels (25≤Ct<34) og lav (34≤Ct<37) bakteriemengde (Figur 28,29,30). I alle forsøk var 93-94 % av prøvene positive for *A. salmonicida*, med noe variasjoner i Ct-verdier.

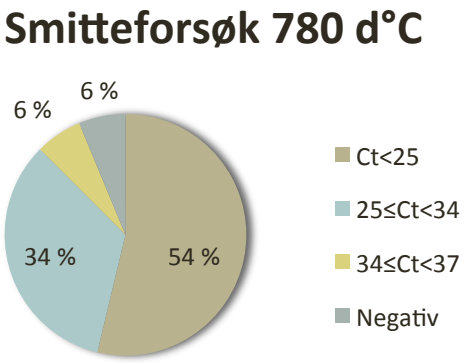
Elongeringsfaktor (påvisning av rognkjeksvev) fungerte som en kvalitetskontroll, og Ct-verdiene var relativt jevne (17 ± 4).



Figur 28: Diagrammet viser resultat for påvisning av *A. salmoncida* ved hjelp av Sanntids RT-PCR for smitteforsøk etter 300 døgngrader.



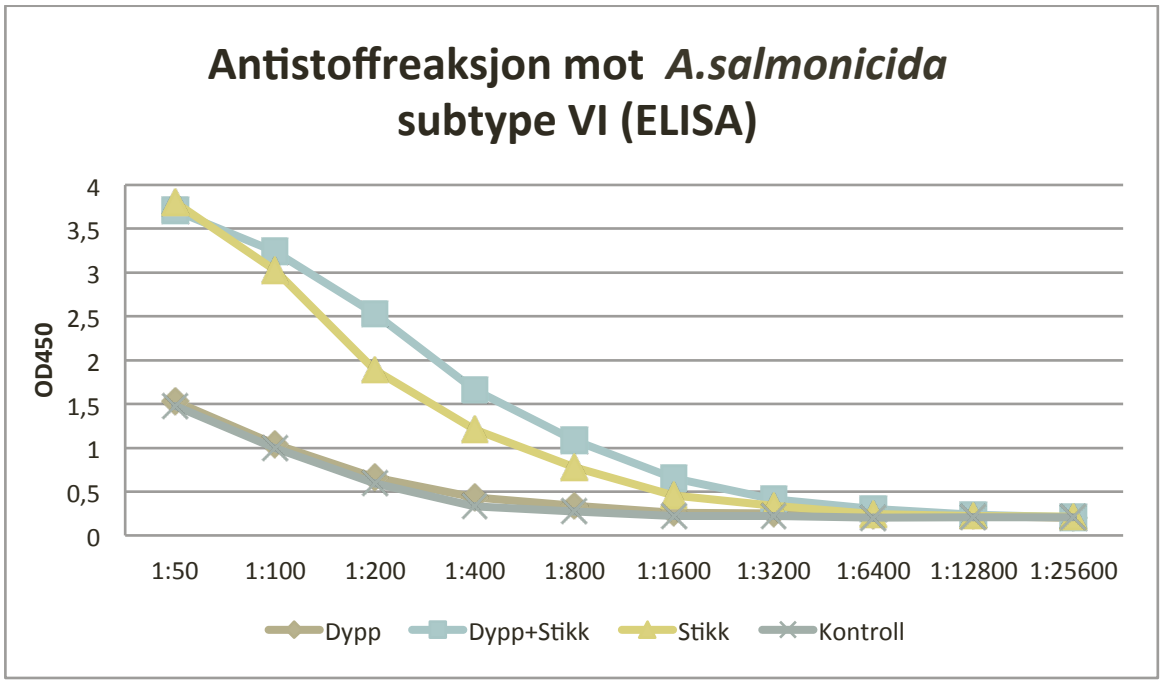
Figur 29: Diagrammet viser Sanntids RT-PCR resultat for smitteforsøk etter 450 døgngrader.



Figur 30: Diagrammet viser Sanntids RT-PCR resultat for smitteforsøk etter 780 døgngrader.

3.10 ELISA

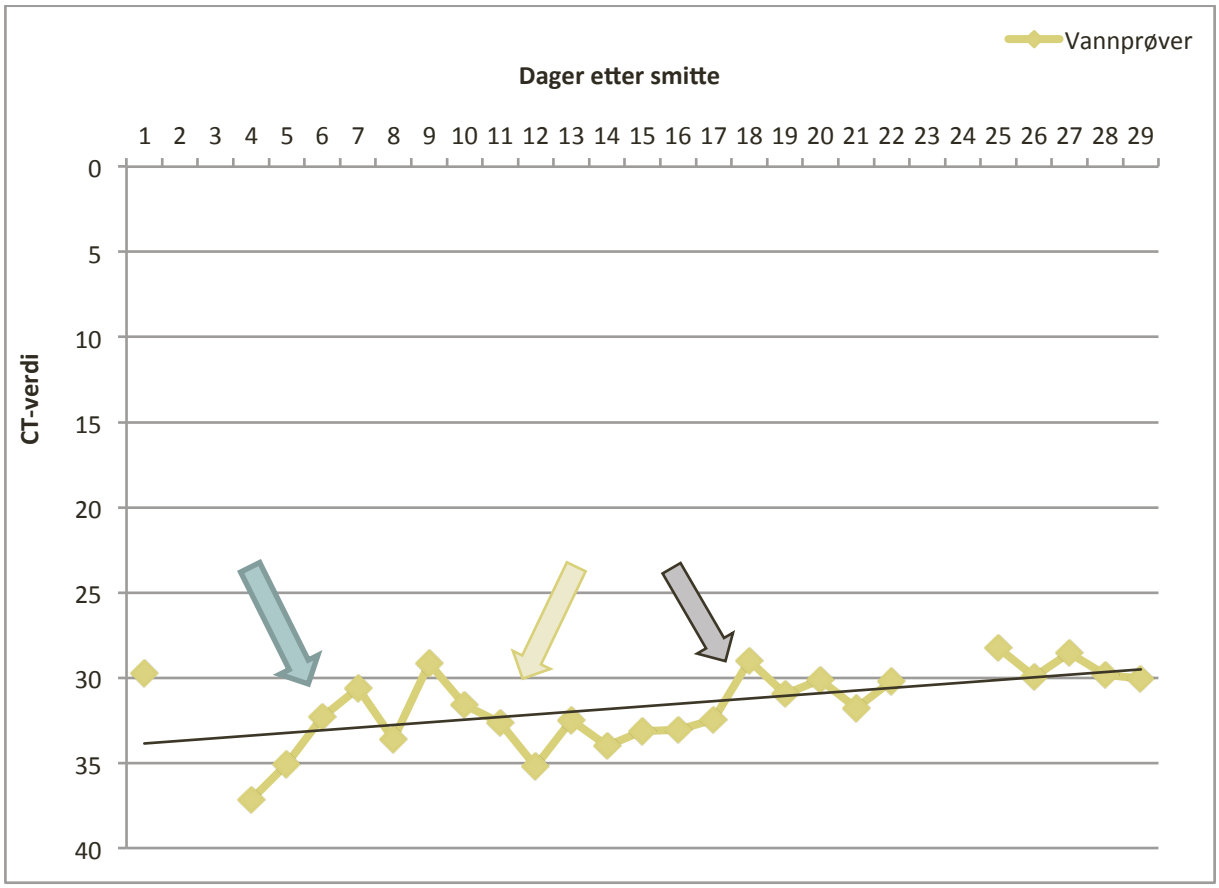
Resultater fra ELISA test viser at vaksinert rognkjeks har dannet spesifikke antistoffer mot *A. salmonicida.* Verdiene som er benyttet fra ELISA test er gjennomsnittet fra to parallelle brønner der bakgrunn er trukket fra. Resultatene for ELISA er presentert som en titreringskurve (Figur 31), der gruppe 2 (dypp+stikk) måler høyest nivåer av antistoffer. Det er tendenser til at gruppe 2 presterer noe bedre enn gruppe 3 (stikk).



Figur 31: Viser en fortynningsserie av serum-pools (n=10) fra hver av rognkjeksgruppene. Blodprøvene ble tatt 780 døgngrader etter stikkvaksinering. Det ble utført en ELISA test med bakterieisolatet av *A. salmonicida* subtype VI som målantigen.

3.11 Sanntids RT-PCR av vannprøver

Vannprøver ble tatt hver dag i hele forsøksperioden fra kar 1 (kohabitantsmitte 780). Vannprøvene ble testet ved hjelp av sanntid RT-PCR for *A. salmonicida*. Alle vannprøvene var positive med unntak av dag 2 og 3 (Figur 32). Dag 23 og 24 etter smitte foreligger det ingen resultater grunnet ødelagte vannprøver. Resultatet viser at det er en generell økende mengde av *A. salmonicida* med nedgående Ct-verdier i vannet.



Figur 32: Viser Ct-verdier fra vannprøver tatt fra kar 1 (kohabitantsmitte 780) for *A. salmonicida* ved hjelp av sanntids RT-PCR (merk: Y-akse har synkende verdier). Vannprøvene fra dag 2 og 3 hadde en negativ CT-verdi. Ingen resultat fra dag 23 og 24 (ødelagte vannprøver). Den blå pilen viser en periode med økning i bakteriemengde i vann, dette koordinerer med dødelighet i startfase hos sheddere. Deretter var det en rolig periode uten særlig dødelighet, og likens en reduksjon i bakteriemengde i vann (gul pil). Den grå pilen representerer siste periode der kohabitanteffekten inntrer og det oppstår en akutt dødelighet i samtlige grupper.

4. Diskusjon

Målet med dette forsøket var å teste ulike vaksineregimer for rognkjeks mot *A. salmonicida* subtype VI. Fra tidligere forsøk ved Universitetet i Tromsø vet man at rognkjeks har en økende immunrespons frem til 600 døgngrader etter stikkevaksinering (Erkinharju, unpub. data). Dette er i praksis en lang tilbakeholdelsestid som er vanskelig å gjennomføre på grunn av rask vekst hos rognkjeks. Det finnes imidlertid ingen kunnskap om når den beskyttende immuniteten er oppnådd. Målsetning med dette prosjektet har vært å undersøke hvor lang tid det tar mellom vaksinering til det er oppnådd beskyttelse mot *A. salmonicida* i rognkjeks. Vaksinebeskyttelse ble testet etter 300, 450 eller 780 døgngrader. I tillegg har det blitt undersøkt om det er mulig å få en raskere beskyttelse ved bruk av ulike kombinasjoner av dypp- og stikkvaksinering.

Før selve forsøkene kunne starte opp ble det etablert en smittemodell for både kohabitant- og i.p. smitte. Dette var helt nødvendig siden det på dette tidspunktet ikke var etablert standardiserte smittemodeller for rognkjeks mot *A. salmonicida*. Det var viktig å gjenskape infeksjonen så naturlig så mulig, slik den ville opptrådd i naturen, med hensyn til forløp, dødelighet, mikroskopisk og makroskopisk patologi. Dette er imidlertid utfordrende siden det er mangelfull kunnskap om klinikk, sykdomsforløp og histopatologi hos rognkjeks med infeksjoner av *A. salmonicida*.

I smitteforsøk 300, 450 og 780 døgngrader ble døde rognkjeks obdusert og prøvetatt for å påvise og dokumentere infeksjon av *A. salmonicida.* Bakterien ble reisolert gjennom nyreutstryk på BA og BAS og identifisert i sanntids RT-PCR. Av ytre kliniske tegn ble det observert noen individer med sår, hudblødninger langs finner og hakeregion og væskefylte øyer med blødninger. Innvendig var vanlige obduksjonsfunn acites og punktblødninger i nyre og lever. I sjeldne tilfeller ble det observert noe som kan oppfattes som granulomer i nyre eller milt. Ved histologisk undersøkelse ble det observert mikrokolonier i nyre, milt, gjeller, hjerte og lever, gjerne omgitt av blødninger, infiltrasjon av betennelsesceller og nekrotisk vev. Begynnende granulomer ble observert i nyre og milt i færre tilfeller. Både makroskopisk og mikroskopisk funn er forenlig med infeksjon av *A. salmonicida.* Hyppig forekomst av granulomer er gjerne forbundet med kroniske former av sykdommen, dette var sjeldne observasjoner som tyder på at sykdomsforløpet har hatt en mer akutt form. Dødelighetskurvene i smitteforsøkene underbygger også denne oppfattelsen. Det akutte

forløpet kan muligens indikere at rognkjeks er svært mottagelig for infeksjoner av *A. salmonicida* subtype VI, eller at det er utviklet en smittemodell som resulterer i for høyt smittepress.

I dette studiet ble det ikke identifisert vaksineindusert beskyttelse i forsøkene med kohabitantsmitte. Det tok 20-25 dager etter smitte før det var registrert dødelighet i samtlige grupper, og den opptrådde akutt (over 70%). I i.p. smitteforsøk var det en signifikant målbar grad av beskyttelse i stikkvaksinerte grupper, i form av forsinket dødelighet, i smitteforsøk 300 og 450. Dette kan ha en positiv effekt i en gjennomvaksinert populasjon da det med høy sannsynlighet vil kunne senke smittepresset i anlegget. Overordnet konklusjon fra dette studiet er likevel at vaksinen mot *A. salmonicida* subtype VI ikke har gitt en tilfredsstillende beskyttelse mot *A. salmonicida* subtype VI, noe som sannsynligvis skyldes flere faktorer som vil bli diskutert her.

En forutsetning for å frembringe effektive vaksiner er at korrekte antigener som gir en beskyttende immunrespons er inkludert. Det er en forutsetning at antigenene har en god kvalitet og rett styrke i vaksinen.

A-laget er pekt på som en helt sentral virulensfaktor for *A. salmonicida*, og bakteriestammer som mangler A-laget er trolig ikke i stand til å indusere en beskyttende immunrespons (Lund et al., 2003). Fullstendig eller delvis tap av funksjonelt A-lag hos *A. salmonicida* subtype VI (isolat NVI-8013) som er benyttet i vaksinen er kanskje en forklaringen på den manglende beskytende effekten av vaksine, men det er vanskelig å dokumentere i ettertid. Tap av funksjonelt A-lag hos *A. salmonicida* er et fenomen er forbundet med flere passasjer i laboratorium (Ishiguro et al., 1981), og i senere studier er det pekt på at *A. salmoncida* subtype VI sannsynligvis er spesielt utsatt for mutasjoner i genet *vapA* som fører til tap av funksjonelt A-lag (Gulla, 2015).

I forbindelse med forberedelser til ELISA ble det utført A-lagstest av vaksineisolat (NVI-8013) på CBB. Resultatet fra testen var hvite og lysblå kolonier, som tyder på at isolatet har delvis eller helt mistet uttrykket for et funksjonelt A-lag. Dette resultatet dokumenter ikke at bakteriene som ble benyttet i vaksinebatchen mangler A-lag, siden materialet kommer fra ulike ampuller og passeringer. Men det understreker at det er en mulighet for vaksineisolatet av *A. salmonicida* subtype VI er utsatt for mutasjoner i *vapA*. Det er derfor viktig å undersøke dette som en kvalitetskontroll av vaksineantigenet.

I hvor stor grad mutasjoner i A-laget er reversibel er det lite kunnskap om, men i forbindelse med passering av *A.salmonicida* gjennom rognkjeks i pilotforsøk 1.2 ble bakterieisolatet på forhånd dyrket på CBB for å kontrollere A-laget. Resultatet var 39 % blå kolonier, mens resterende var hvite. Da bakterien ble reisolert fra rognkjeks etter smitteforsøk ble den på ny dyrket på CBB, det vokste det kun opp mørkeblå kolonier. En mulig forklaring kan være at bakteriene uten A-lag (A-) har blitt selektert ut i rognkjeksen, siden A-laget er en essensiell virulensfaktor har trolig bakterier med A-lag (A+) hatt et konkurransefortrinn. En annen mulig forklaring kan være at mutasjonen i *vapA* reverserer tilbake når miljøbetingelsene (fisk) endres.

Det ble utført et smitteforsøk (VESO Vikan) der rognkjeks ble stikkvaksinert med den samme injeksjonsvaksinen som er benyttet dette forsøket, og deretter smittet med *A. salmonicida* subtype V og VI. I forsøket var resultatet at det var en høy overlevelse blant rognkjeksen som ble smittet med *A. salmonicida* subtype V. Rognkjeksen som ble smittet med *A. salmonicida* subtype VI hadde, akkurat som dette forsøket, en høy akkumulert dødelighet (Vaxxinova, unpub. data). Dette er en sterk indikator på at sammensetning i vaksine ikke er optimale mot *A. salmonicida* subtype VI.

Det er ikke bare korrekte antigener som må inkluderes i en vaksine for å oppnå en vellykket beskyttende immunrespons, mengden antigener i vaksinen er også helt essensielt. Det er kanskje en mulig forklaring at titreringsdose av antigen i vaksine er for lav. Det er vist for noen agens at det er korrelasjon mellom mengde antigendose i vaksine og graden av beskyttende immunrespons (Gudding et al., 2014). I vaksinen har det blitt benyttet en antigenkonsentrasjon av *A. salmonicida* tilsvarende for vaksiner beregnet til laks, men det er en mulighet at rognkjeks behøver høyere konsentrasjoner for å oppnå en beskyttende immunitet.

Det ble utført ELISA test for å detektere antistoffer mot *A. salmonicida*, resultatet viser at rognkjeksen har utviklet en humoral immunrespons gjennom vaksinering mot *A. salmonicida*. Rognkjeks som var stikkvaksinert (gruppe 2 og 3) utviklet et høyere nivå av antistoffer enn uvaksinerte grupper (gruppe 1 og 4). Man ser muligens en tendens til bedre antistoffreaksjon i gruppe 2 (dypp + stikk) enn i gruppe 3 (stikk), men dette kan skyldes individuelle forskjeller. En svakhet med serumpools er at det ikke viser individuelle forskjeller, dermed kan eventuelle ekstremverdier påvirke resultatet uten at det avsløres. I tidligere forsøk der regnbueørret ble dyppvaksinert mot *A. salmonicida* ble det vist at grupper som var dyppvaksinert hadde et høyere nivå av antistoffdannelse enn uvaksinert grupper ved bruk av

ELISA (Villumsen and Raida, 2013). Kontrollgruppen hadde relativt høye verdier av antistoffer. Det kan trolig være flere forklaringer, en mulighet kan være at naturlige antistoffer binder seg til en viss grad i ELISA testen. En annen hypotese kan være at antistoffer som har blitt dannet mot andre bakterier binder seg, f.eks. LPS molekyler, som en kryssreaksjon.

En mulig årsak til høy akkumulert dødeligheten i både i.p.- og kohabitantforsøkene kan være at smittepresset har vært for høyt. Dødelighet i en ideell smittemodell bør ikke overstige 60-80 prosent (kontrollgruppe), årsaken til dette er fordi de fleste vaksiner før eller siden vil gi etter dersom smittepresset blir for høyt (Krossøy, pers. comm). I smitteforsøkene, både kohabitant og i.p., hadde kontrollgrupper en akkumulert dødelighet over 80 prosent . I tillegg var dødeligheten fortsatt på vei oppover ved avslutning av forsøkene, og hadde muligens nådd 100 prosent. Dette indikerer at smittepresset har vært for høyt for et vaksineforsøk, ideelt sett bør dødeligheten flate ut mot slutten av forsøket.

Vannprøver ble tatt hver dag fra kar 1 (kohabitantsmitte 780 d°C) for å undersøke hvordan smittepresset utviklet seg i løpet av forsøksperiode. En trendlinje viser at det er en jevn økning i smittepress underveis i forsøksperiode. Men det er noe svingninger i Ct-verdi underveis, som kan til en viss grad korreleres med dødelighet og smittepress.

En faktor som trolig har bidratt til at smittepresset har blitt høyt, er den lave andelen stikkvaksinerte individer i hvert enkelt kar. I forsøkene var 30 prosent (kohab) og 52 prosent (i.p.) av individene stikkvaksinert, som er lav flokkimmunitet. En mulighet er at vaksinen i større grad hadde fungert dersom en høyere andel individer hadde vært stikkvaksiner.

Valg av smittemodell kan også være avgjørende for resultatet i et vaksineforsøk. Jevn over presterte de stikkvaksinerte rognkjeksgruppene bedre enn kontroll- og dyppgrupper i forsøkene med i.p. smitte, ved dødeligheten startet på et senere tidspunkt. Den samme tendensen var ikke til stede i forsøkene med kohabitantsmitte. Når effekten av en vaksine skal testes i et i.p. smitteforsøk kan det i noen tilfeller se ut som vaksinen presterer bedre enn den faktisk gjør. Dette er et resultat av en lokal uspesifikk immunitet i bukhulen, samme sted som vaksinen ble applikert (Nordmo and Ramstad, 1997).

En mulig indikasjon for at vaksineindusertbeskyttelse observert i i.p. smitteforsøkene skyldes en lokal immunitet i bukhule er at det ble observert en jevn reduksjon i graden av beskyttelse ved økende døgngrader. I i.p. smitte 300 døgnrader hadde stikkvaksinerte rognkjeksgrupper høyest overlevelse etter 30 dager, sammenlignet med i.p. smitte 780 som hadde lavere overlevelse på et tidligere tidspunkt. Det kan kanskje være en sammenheng med grad av

inflammasjon i bukhulen etter vaksinering. I prøveresultater for Sanntids RT-PCR ble det observert færre individer med ”høy” bakteriemengde i smitteforsøk 300 enn de to senere forsøkene, den samme observasjonen ble også gjort for nyreutstryk på BA og BAS. Dette er kanskje tilfeldig, men det kan muligens ha en sammenheng med uspesifikk bukhule immunitet.

Dette belyser kanskje viktigheten av å benytte en kohabitant- eller badsmittemodell når vaksineindusert beskyttelse skal dokumenteres. I noen tilfeller kan kanskje dette forklare hvorfor en vaksine presterte bra i lukkede smitteforsøk, men dårlig i feltforsøk. En kohabitant eller badsmittemodell vil i høyere grad være en bedre smittemodell for å oppnå et naturlig smitteforløp. Smitteveien vil være vannbårent, og fisken må derfor i større grad bruke hele repertoaret av immunmekanismer, både innvendig og utvendig, for å beskytte seg (Nordmo and Ramstad, 1997).

Smittepresset i kohabitantmodellen ble vurdert som spesielt tøft i dette studiet, og det ble evaluert om smittemodellen med to smittedoser til sheddere gav for høyt smittepress. Det ble på bakgrunn av dette besluttet å bare gi en dose i det siste kohabitantforsøket, men dødeligheten opptrådde fortsatt like alvorlig. Den minste taperfisken ble separert ut og benyttet som sheddere til kohabitantforsøk, dette var kanskje ikke den mest optimale løsningen, men den eneste siden det ellers ville blitt for lite fisk til smitteforsøkene. Sheddere var små og var kanskje i større grad mottagelig for sykdom, som kan ha bidratt til økt smittepress. Allikevel har det sannsynligvis ikke vært den mest utslagsgivende faktoren. I i.p. smitteforsøkene opptrådde det en ”sekundærbølge” med akutt dødelig mot slutten av forsøkene. Denne dødeligheten skyldes trolig kohabitantsmitte fra de første dødende individene i forsøksperiode. Det er tydelig i dette studiet at vannbåren kohabitantsmitte har vært mer potent enn i.p. smitte.

For å oppnå et vellykket resultat fra vaksinering er det essensielt at fisken har en generell god helsestatus. Siden rognkjeks er en ny oppdrettsart er det lite kunnskap om hvilke innvirkning ulike miljøfaktorer har på helsestatusen. Det er også lite kunnskap om rognkjeks sine ernæringskrav, og om dagens rognkjeksfôr dekker fisken sitt behov. Det er i tillegg er det flere lidelser med ukjent årsak, som katarakt og leverpatologi, som trolig svekker den generelle gode helsen til rognkjeks. Videre er det ikke satt i gang noe avlsarbeid, man har derfor ikke noe kunnskap om noen er mer genetisk disponible for infeksjoner av *A. salmonicida* enn andre.

En svakhet med smittemodellen som muligens har svekket helsestatusen til rognkjeksen, er den høye temperaturen som ble benyttet under smitteforsøkene. Siden rognkjeks er en ny oppdrettsart er det relativt lite kunnskap om hvilke innvirkninger høye temperaturer har på dens fysiologi, men det ser ut til at rognkjeks blir sårbar og lett mottagelig for sykdom under høye temperaturer. I et upublisert forsøk ble temperaturtoleransen til rognkjeks undersøk ved å måle hjerteraten under gradvis oppvarming av vannet, det viste seg at rognkjeksen generelt ikke trivdes og ble stresset da temperatur gikk over 14-16 °C (Iversen, pers.comm.). Fisk sin robusthet påvirkes i stor grad når den er stresset, og det er velkjent hos laksefisk at kortikosteroider som frigis under stressresponser har en immunsupressive effekt (Waagbø et al., 2001). Det er også kjent at vanntemperaturer har direkte innvirkning på regulering av immunforsvaret hos kaldblodig dyr (Bly and Clem, 1992). I hvilke grad immunforsvaret til rognkjeks påvirkes av høye temperaturer er det ingen kunnskap om. Men dødelighetsregistreringer hos rognkjeks etter utsett tyder på at den er sårbar under høye temperaturer, ved temperaturer mellom 7-15 ºC var det registrert en betydelig økning i dødelighet (Dahl, 2017). Det er viktig å poengtere at tilsvarende høye temperaturer er helt reelt ute i felt. En svekket fisk gir bakterier og andre mikroorganismer et stort konkurransefortrinn til å etablere seg. Høy temperatur vil også gi bakterien et annet fortrinn, *A. salmonicida* vokser rasker under høye temperaturer, ideelt sett 20-25 °C (Austin and Austin, 2016).

I et nylig publisert forsøk ble vaksinert og uvaksinert rognkjeks smittet med *A. salmonicida* uten A-lag (A^-) ved 12 ºC der det ble registrert lav dødelighet i alle grupper. Etter en temperaturøkning til 16 °C ble det en økning i dødeligheten både hos vaksinert og uvaksinert fisk. Under slike betingelser viste ikke den vaksinerte rognkjeksen noe signifikant forbedret overlevelse enn de uvaksinerte (Rønneseth et al., 2017). Denne studien indikerer at selv lavvirulente bakteriestammer kan drepe rognkjeks under høye temperaturer, en annen mulig forklaring kan være at rognkjeksen dør direkte av temperaturøkningen. I smitteforsøk 300, 450 og 780 døgngrader etter stikkvaksinering ble det benyttet en vanntemperatur på 15 °C, og det er kanskje en mulighet for rognkjeksen under slike betingelser ble svekket i så stor grad at en hvilken som helst vaksine ikke ville fungert.

I forkant av smitteforsøkene ble det tatt nullprøver av forsøksfisken for å utelukke infeksjoner av *A. salmonicida*, både bakteriologi og sanntids RT-PCR kunne ikke påvise bakterien. Rognkjeksen ble ikke screenet for andre patogen, dermed kan ikke parasitter og virus

fullstendig utelukkes. Men lav dødelighet hos forsøksfisk i forkant av smitte gir ingen grunn til mistanke om andre pågående infeksjoner.

Forsøksfisken ble bedøvet med Finquel vet. i forbindelse med stikkvaksinering, merking og i.p. smitte. Det ser ut til at rognkjeks takler bedøving dårlig og bruker lang tid på å regenerere, det har derfor vært diskutert om det er en større påkjenning at den blir bedøvd enn selve håndteringen (FHF dialogmøte 2016). Det er derfor en mulighet for at rognkjeksen i forsøket ville hatt et bedre utgangspunkt dersom den ikke hadde blitt bedøvd.

Det ble også observert ved histologi noe som sterkt minner om ansamlinger av betennelsesceller i lever til majoriteten av forsøksfisk, uavhengig av sykdom- og vaksinestatus. De samme funnene ble også observert i et pågående vaksineforsøk i felt, og fisken ble screenet for Flavivirus som er forbundet med leverpatologi hos rognkjeks, prøvene var negative (Sæbjørnsen, 2017). Hva som årsaken til de histopatologiske forandringene observert i lever er ukjent, men det har trolig ikke påvirket til en ”generell god helsestatus”.

5. Konklusjon

Overordnet konklusjon fra dette studiet er at vaksinen mot *A. salmonicida* subtype VI ikke har gitt en tilfredsstillende beskyttelse, og man vet per dags dato ikke hva som er årsaken. Det er flere mulige faktorer som kan ha hatt innvirkning på resultatet:

- Sammensetning av vaksine: Fravær av essensielle antigen eller for lav titreringsmengde.
- For høyt smittepress i smittemodell: De fleste vaksiner vil gi etter dersom smittepresset blir for høyt. Smittemodell som ble etablert i dette studiet for både kohabitant- og i.p. smitte ser ut til å resultere i et akutt sykdomsforløp som indikerer et høyt smittepress.
- Svekket helsestatus hos forsøksfisk: Temperatur og andre ugunstige miljøfaktorer kan ha svekket rognkjeksen.

Forslag til videre arbeid er å utvikle en mer egnet smittemodell for rognkjeks og vaksineforsøk. Det bør også utføres regelmessig testing av A-laget til vaksineisolater, samt nærmere undersøkelser om vaksinen inneholder for lav mengde antigen. Det bør etableres bedre kunnskap om faktorer som kan svekke rognkjeks sin generelle gode helsestatus.

Litteraturliste

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. & PILLAI, S. 2012. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*, Elsevier Health Sciences.

ADAMS, A. 2016. *Fish vaccines*, Springer.

ALARCÓN, M., GULLA, S., RØSAEG, M., RØNNESETH, A., WERGELAND, H., POPPE, T., NILSEN, H. & COLQUHOUN, D. 2016a. Pasteurellosis in lumpsucker Cyclopterus lumpus, farmed in Norway. *Journal of fish diseases,* 39**,** 489.

ALARCÓN, M., THOEN, E., POPPE, T., BORNØ, G., MOHAMMAD, S. & HANSEN, H. 2016b. Co‐infection of Nucleospora cyclopteri (Microsporidia) and Kudoa islandica (Myxozoa) in farmed lumpfish, Cyclopterus lumpus L., in Norway: a case report. *Journal of fish diseases,* 39**,** 411-418.

AMEND, D. F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Fish biologics: serodiagnostics and vaccines*.

ANDERSEN, L., HODNELAND, K. & NYLUND, A. 2010. No influence of oxygen levels on pathogenesis and virus shedding in Salmonid alphavirus (SAV)-challenged Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Virology journal,* 7**,** 198.

AUSTIN, B. & AUSTIN, D. A. 2016. *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, Springer Science & Business Media.

AUSTIN, D., MCINTOSH, D. & AUSTIN, B. 1989. Taxonomy of fish associated Aeromonas spp., with the description of Aeromonas salmonicida subsp. smithia subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology,* 11**,** 277-290.

BAKKETEIG., I. E., HAUGE M., KVAMME C., SUNNSET B.H. OG TOFT K.Ø. (RED). 2016. Rognkjeks/-kall. *Havforskningsrapporten 2016. Fisken og havet, særnr.1-2016***,** 171.

BEAZ‐HIDALGO, R. & FIGUERAS, M. 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.

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.

BERTHE, F. C., MICHEL, C. & BERNARDET, J.-F. 1995. Identification of Pseudomonas anguilliseptica isolated from several fish species in France. *Diseases of Aquatic Organisms,* 21**,** 151.

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.

BJORDAL, Å. Cleaning symbiosis between wrasses (Labridae) and lice infested salmon (Salmo salar) in mariculture. 1988. ICES.

BLY, J. E. & CLEM, L. W. 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunology,* 2**,** 159-171.

BORNØ, G., ALARCÓN, M., LINAKER, M., COLQUHOUN, D., NILSEN, H., GU, J., GJERSET, B., HANSEN, H., THOEN, E. & GULLA, S. 2016. Akutt dødelighet hos rognkjeks (Cycloterus lumpus) i 2015. *Veterinærinstituttets rapportserie. Veterinærinstituttet (The Norwegian Veterinary Institute), Oslo*.

BRUNO, D., NOGUERA, P. A. & POPPE, T. T. 2013. *A colour atlas of salmonid diseases*, Springer Science & Business Media.

BURR, S. E., STUBER, K., WAHLI, T. & FREY, J. 2002. Evidence for a type III secretion system in Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida. *Journal of bacteriology,* 184**,** 5966-5970.

BURRIDGE, L., WEIS, J. S., CABELLO, F., PIZARRO, J. & BOSTICK, K. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture,* 306**,** 7-23.

CHAPMAN, P. F., CIPRIANO, R. C. & TESKA, J. D. 1991. Isolation and phenotypic characterization of an oxidase-negative Aeromonas salmonicida causing furunculosis in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Journal of wildlife diseases,* 27**,** 61-67.

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.

COLWELL, R., MACDONELL, M. & DE LEY, J. 1986. Proposal to Recognize the Family Aeromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 36**,** 473-477.

COSTELLO, M. J. 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of fish diseases,* 32**,** 115-118.

DACANAY, A., KNICKLE, L., SOLANKY, K., BOYD, J., WALTER, J., BROWN, L., JOHNSON, S. & REITH, M. 2006. Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida. *Microbiology,* 152**,** 1847-1856.

DAHL, E. L. Strategisk bruk av rensefisk Rensefiskkonferansen, 2017.

DALLAIRE-DUFRESNE, S., TANAKA, K. H., TRUDEL, M. V., LAFAILLE, A. & CHARETTE, S. J. 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary microbiology,* 169**,** 1-7.

DALSGAARD, I., GUDMUNDSDÓTTIR, HELGASON, HØIE, THORESEN, WICHARDT, WIKLUND 1998. Identification of atypical Aeromonas salmonicida : inter‐laboratory evaluation and harmonization of methods. *Journal of Applied Microbiology,* Vol.84(6.

DALVIN, S., SKERN-MAURITZEN, R., ESPEDAL, P.G., 2010. Resistens og lakselus. *Havforskningsrapporten 2010***,** 107-108.

DALY, J. G., KEW, A. K., MOORE, A. R. & OLIVIER, G. 1996. The cell surface ofAeromonas salmonicidadeterminesin vitrosurvival in cultured brook trout (Salvelinus fontinalis) peritoneal macrophages. *Microbial pathogenesis,* 21**,** 447-461.

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.

DOIG, P. & EMÖDY, L. 1992. Binding of laminin and fibronectin by the trypsin-resistant major structural domain of the crystalline virulence surface array protein of Aeromonas salmonicida. *Journal of Biological Chemistry,* 267**,** 43-49.

DRANGSHOLT, T. M. K., NIELSEN, H. M., BARANSKI, M. & JACQ, C. 2015. Stamfiskforvaltning og avlsstrategier for rognkjeks (Cyclopterus lumpus. Arbeidspakke 5 i strategisk institutt satsing (SIS) prosjektet om rognkjeks.

ELLIS, A. 1991. An appraisal of the extracellular toxins of Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida. *Journal of Fish Diseases,* 14**,** 265-277.

EVENBERG, D. & LUGTENBERG, B. 1982. Cell surface of the fish pathogenic bacterium Aeromonas salmonicida: II. Purification and characterization of a major cell envelope protein related to autoagglutination, adhesion and virulence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,* 684**,** 249-254.

FIJAN, N. N. & MAWDESLEY-THOMAS, L. 1972. Infectous dropsy in carp-a disease complex. *Diseases of fish***,** 39-51.

FISKERIDIREKTORATET 2016a. Statistikk for akvakultur 2015 - forløpige tall

FISKERIDIREKTORATET. 2016b. *Total utsett av rensefisk i merd* [Online]. Available: http://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk [Accessed 24.09 2016].

GARDUÑO, R. A., MOORE, A. R., OLIVIER, G., LIZAMA, A. L., GARDUÑO, E. & KAY, W. W. 2000. Host cell invasion and intracellular residence by Aeromonas salmonicida: role of the S-layer. *Canadian journal of microbiology,* 46**,** 660-668.

GARROTE, A., BONET, R., MERINO, S., SIMON-PUJOL, M. D. & CONGREGADO, F. 1992. Occurrence of a capsule in Aeromonas salmonicida. *FEMS microbiology letters,* 95**,** 127-131.

GRIFFIN, P. J., SNIESZKO, S. & FRIDDLE, S. 1953. A more comprehensive description of Bacterium salmonicida. *Transactions of the American Fisheries Society,* 82**,** 129-138.

GUDDING, R. 2000. *Immunprofylakse i veterinærmedisinen*.

GUDDING, R., LILLEHAUG, A. & EVENSEN, Ø. 2014. *Fish Vaccination*.

GUDMUNDSDÓTTIR, B. K. & BJÖRNSDÓTTIR, B. 2007. Vaccination against atypical furunculosis and winter ulcer disease of fish. *Vaccine,* 25**,** 5512-5523.

GULLA, S. 2015. *Introductory studies on bacterial agents infecting cleaner fish.* PhD Thesis 2015:98, Norwegian University of Life Sciences.

GULLA, S., LUND, V., KRISTOFFERSEN, A., SØRUM, H. & COLQUHOUN, D. 2015. vapA (A-layer) typing differentiates Aeromonas salmonicida subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes. *Journal of Fish Diseases*.

HAMRE, L. A., EICHNER, C., CAIPANG, C. M. A., DALVIN, S. T., BRON, J. E., NILSEN, F., BOXSHALL, G. & SKERN-MAURITZEN, R. 2013. The salmon louse Lepeophtheirus salmonis (Copepoda: Caligidae) life cycle has only two chalimus stages. *PloS one,* 8**,** e73539.

HANSEN, J. D., LANDIS, E. D. & PHILLIPS, R. B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 102**,** 6919-6924.

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*.

HELGESEN, K. O., ROMSTAD, H., AAEN, S. M. & HORSBERG, T. E. 2015. First report of reduced sensitivity towards hydrogen peroxide found in the salmon louse Lepeophtheirus salmonis in Norway. *Aquaculture Reports,* 1**,** 37-42.

HELLBERG, H., MOKSNESS, E. & HØIE, S. 1996. Infection with atypical Aeromonas salmonicida in farmed common wolffish, Anarhichas lupus L. *Journal of Fish Diseases,* 19**,** 329-332.

HEUCH, P., NORDHAGEN, J. & SCHRAM, T. 2000. Egg production in the salmon louse [Lepeophtheirus salmonis (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. *Aquaculture Research,* 31**,** 805-814.

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.

HIDAKA, T., YANOHARA, Y. & SHIBATA, T. 1983. Bacteria associated with head ulcer disease in cultured eels. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kogoshima University,* 32**,** 147-165.

HIRST, I. & ELLIS, A. 1994. Iron-regulated outer membrane proteins of Aeromonas salmonicida are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology,* 4**,** 29-45.

HIRST, I. D., HASTINGS, T. S. & ELLIS, A. E. 1991. Siderophore production by Aeromonas salmonicida. *Microbiology,* 137**,** 1185-1192.

HJELTNES, B., BORNØ, G, JANSEN, M D, HAUKAAS, A, WALDE, C (RED), 2017. Fiskehelserapporten 2016. *Veterinærinstituttet.*

HJELTNES, B., WALDE, BANG JENSEN, HAUKAAS (RED.) 2016. Fiskehelserapporten 2015

. Veterinærinstituttet.

HOLLAND, M. C. H. & LAMBRIS, J. D. 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology,* 12**,** 399-420.

HUREAU, J., BAUCHOT, M., NIELSEN, J. & TORTONESE, E. 1986. Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean Vol. 3.

IMSLAND, A. K., REYNOLDS, P., ELIASSEN, G., HANGSTAD, T. A., NYTRØ, A. V., FOSS, A., VIKINGSTAD, E. & ELVEGÅRD, T. A. 2014. Assessment of growth and sea lice infection levels in Atlantic salmon stocked in small-scale cages with lumpfish. *Aquaculture,* 433**,** 137-142.

INGÓLFSSON, A., KRISTJÁNSSON, B. K. & SCHAEFER, S. 2002. Diet of juvenile lumpsucker Cyclopterus lumpus (Cyclopteridae) in floating seaweed: effects of ontogeny and prey availability. *Copeia,* 2002**,** 472-476.

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.

JIMENEZ, N., LACASTA, A., VILCHES, S., REYES, M., VAZQUEZ, J., AQUILLINI, E., MERINO, S., REGUÉ, M. & TOMÁS, J. M. 2009. Genetics and proteomics of Aeromonas salmonicida lipopolysaccharide core biosynthesis. *Journal of bacteriology,* 191**,** 2228-2236.

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 rensefisk for kontroll av lakselus.

JONASSEN, T., HAMADI, M., REYNOLDS, P., NYTRØ, A., IMSLAND, A., 2016a. Forekomst og mulige årsak til katarakt hos rognkjeks. *Akvaplan-niva AS*.

JONASSEN, T. M., LEIN, I. 2016b. Sammenstilling av seks produksjonsanlegg for Rognkjeks, 2015.

KABATA, Z. 1979. *Parasitic copepoda of British fishes*, Ray Society.

KARLSBAKK, E. 2014. Sykdom og parasitter i vill og oppdrettet rognkjeks [Diseases and parasites of lumpsucker (Cyclopterus lumpus)]. *Fisken og Havet***,** 37-39.

KAY, W., BUCKLEY, J., ISHIGURO, E., PHIPPS, B. & MONETTE, J. 1981. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of Aeromonas salmonicida. *Journal of bacteriology,* 147**,** 1077-1084.

KAY, W., PHIPPS, B. & ISHIGURO, E. 1985. Porphyrin binding by the surface array virulence protein of Aeromonas salmonicida. *Journal of bacteriology,* 164**,** 1332-1336.

KIM, D.-H., CHOI, S.-Y., KIM, C.-S., OH, M.-J. & JEONG, H.-D. 2013. Low-value fish used as feed in aquaculture were a source of furunculosis caused by atypical Aeromonas salmonicida. *Aquaculture,* 408**,** 113-117.

KIMURA, T. 1969. A new subspecies of Aeromonas salmonicida as an etiological agent of furunculosis on "Sakuramasu"(Oncorhynchus masou) and pink salmon (O. gorbuscha) rearing for maturity. *Fish Pathology,* 3**,** 34-44.

KOPPANG, E., FJØLSTAD, M., MELGÅRD, B. & VIGERUST, M. 2000. Non‐pigment‐producing isolates of Aeromonas salmonicida subspecies salmonicida: isolation, identification, transmission and pathogenicity in Atlantic salmon, Salmo salar L. *Journal of Fish Diseases,* 23**,** 39-48.

KVENSETH, P. 2011. Leppefiskhistorie fra 1967 til 2010-og ti år frem i tid. *Norsk Fiskeoppdrett 6a Rensefisk***,** 12-13.

LAZADO, C. C. & CAIPANG, C. M. A. 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & shellfish immunology,* 39**,** 78-89.

LEGEMIDDELLOVEN Lov om legemidler m.v. (legemiddelloven).

LEHMANN, K. & NEUMANN, R. 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie. *J. F. Lehmann, Munich*.

LOVDATA.NO. 2012. *Forskrift om bekjempelse av lus i akvakulturanlegg* [Online]. Available: https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140 [Accessed 05.09 2016].

LUND, V., ARNESEN, J. A., 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.

MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology,* 20**,** 137-151.

MARCOS-LÓPEZ, M., DONALD, K., STAGG, H. & MCCARTHY, U. 2013. Clinical Vibrio anguillarum infection in lumpsucker Cyclopterus lumpus in Scotland. *The Veterinary record,* 173**,** 319-319.

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*.

MASADA, C. L., LAPATRA, S. E., MORTON, A. W. & STROM, M. S. 2002. An Aeromonas salmonicida type IV pilin is required for virulence in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. *Diseases of Aquatic Organisms,* 51**,** 13-25.

MASSO-SILVA, J. A. & DIAMOND, G. 2014. Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals,* 7**,** 265-310.

MCINTOSH, D. & AUSTIN, B. 1991. Atypical characteristics of the salmonid pathogen Aeromonas salmonicida. *Microbiology,* 137**,** 1341-1343.

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. & WEAVER, C. 2016. *Janeway's immunobiology*, Garland Science.

NILSEN, A., VILJUGREIN, H., RØSÆG, M. V. & COLQUHOUN, D. 2014. Rensefiskhelse–kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker. *Veterinærinstituttet, Oslo*.

NORDMO, R. & RAMSTAD, A. 1997. Comparison of different challenge methods to evaluate the efficacy of furunculosis vaccines in Atlantic salmon, Salmo salar L. *Journal of Fish Diseases,* 20**,** 119-126.

PAVAN, M., ABBOTT, S., ZORZOPULOS, J. & JANDA, J. 2000. Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 50**,** 1119-1124.

PETHON, P. & NYSTRÖM, B. O. 1998. *Aschehougs store fiskebok: Norges fisker i farger*, Aschehoug.

PHIPPS, B. & KAY, W. W. 1988. Immunoglobulin binding by the regular surface array of Aeromonas salmonicida. *Journal of Biological Chemistry,* 263**,** 9298-9303.

PIKE, A. 1989. Sea lice—major pathogens of farmed Atlantic salmon. *Parasitology today,* 5**,** 291-297.

POPPE, T. T. & BERGH, Ø. 2002. *Fiskehelse og fiskesykdommer*, Universitetsforlaget.

PRESS, C. M. & EVENSEN, Ø. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology,* 9**,** 309-318.

REECE, J. B., URRY, L. A., CAIN, M. L., WASSERMAN, S. A., MINORSKY, P. V. & JACKSON, R. B. 2013. *Campbell biology*, Pearson Higher Ed.

REITH, M. E., SINGH, R. K., CURTIS, B., BOYD, J. M., BOUEVITCH, A., KIMBALL, J., MUNHOLLAND, J., MURPHY, C., SARTY, D. & WILLIAMS, J. 2008. The genome of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC genomics,* 9**,** 1.

ROBERTS, R. J. 2012. *Fish pathology*, John Wiley & Sons.

ROCKEY, D., FRYER, J. & ROHOVEC, J. 1988. Aeromonas salmonicida. *Diseases of aquatic organisms,* 5**,** 197-204.

RØNNESETH, A., GHEBRETNSAE, D. B., WERGELAND, H. I. & HAUGLAND, G. T. 2015. Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (Cyclopterus lumpus L.). *Developmental & Comparative Immunology,* 52**,** 132-143.

RØNNESETH, A., HAUGLAND, G. T., COLQUHOUN, D. & WERGELAND, H. I. 2014. Utvikling av smittemodeller på oppdrettet rognkjeks.

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*.

SAURABH, S. & SAHOO, P. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research,* 39**,** 223-239.

SCHUBERT, R. H. 1967. The taxonomy and nomenclature of the genus Aeromonas Kluyver and van Niel 1936. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 17**,** 23-37.

SKIFTESVIK, A. B., MORTENSEN, S., BJELLAND, R. M. 2016. Bruk av rensefisk - muligheter og begrensninger *Havforskningsrapporten 2016***,** 26-28.

SMITH, I. W. 1963. The classification of 'Bacterium salmonicida'. *Microbiology,* 33**,** 263-274.

SMÅGE, S. B., FRISCH, K., BREVIK, Ø. J., WATANABE, K. & NYLUND, A. 2016. First isolation, identification and characterisation of Tenacibaculum maritimum in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish Cyclopterus lumpus L. *Aquaculture,* 464**,** 178-184.

SOMMERSET, I., KROSSØY, B., BIERING, E. & FROST, P. 2014. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*.

SSB. 2016. *Akvakultur, 2015, foreløpige tall* [Online]. Available: https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar-forelopige/2016-06-02 [Accessed 31.08 2016].

STAR, B., NEDERBRAGT, A. J., JENTOFT, S., GRIMHOLT, U., MALMSTRØM, M., GREGERS, T. F., ROUNGE, T. B., PAULSEN, J., SOLBAKKEN, M. H. & SHARMA, A. 2011. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature,* 477**,** 207-210.

SUNDNES, H. M. 2016. Rensefisknæringen: status og veien videre *Norsk Fiskerinæring,* utgave 1**,** 96-105.

SWIFT, S., KARLYSHEV, A. V., FISH, L., DURANT, E. L., WINSON, M. K., CHHABRA, S. R., WILLIAMS, P., MACINTYRE, S. & STEWART, G. 1997. Quorum sensing in Aeromonas hydrophila and Aeromonas salmonicida: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Journal of bacteriology,* 179**,** 5271-5281.

SÆLE, Ø. Hva vet vi om ernæring hos rensefisk? Rensefiskkonferansen 2017, 2017.

THERNEAU, T. 2015. A Package for Survival Analysis in S. version 2.38. ht tp. *cran. r-project. org/package= survival*.

THERNEAU, T. M. & GRAMBSCH, P. M. 2000. Expected survival. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model.* Springer.

UDEY, L. & FRYER, J. 1978. Immunization of fish with bacterins of Aeromonas salmonicida. *Mar Fish Rev,* 40**,** 12-7.

URIBE, C., FOLCH, H., ENRIQUEZ, R. & MORAN, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina,* 56**,** 486-503.

VILLUMSEN, K. R. & RAIDA, M. K. 2013. Long-lasting protection induced by bath vaccination against Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida in rainbow trout. *Fish & shellfish immunology,* 35**,** 1649-1653.

WAKABAYASHI, H. & EGUSA, S. 1972. Characteristics of a Pseudomonas sp. from an epizootic of pond-cultured eels (Anguilla japonica). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,* 38**,** 577-587.

WANG, Z., LIU, X., DACANAY, A., HARRISON, B. A., FAST, M., COLQUHOUN, D. J., LUND, V., BROWN, L. L., LI, J. & ALTMAN, E. 2007. Carbohydrate analysis and serological classification of typical and atypical isolates of Aeromonas salmonicida: A rationale for the lipopolysaccharide-based classification of A. salmonicida. *Fish & shellfish immunology,* 23**,** 1095-1106.

WHITTINGTON, R., GUDKOVS, N., CARRIGAN, M., ASHBURNER, L. & THURSTAN, S. 1987. Clinical, microbiological and epidemiological findings in recent outbreaks of goldfish ulcer disease due to atypical Aeromonas salmonicida in south‐eastern Australia. *Journal of Fish Diseases,* 10**,** 353-362.

WIKLUND, T. & BYLUND, G. 1990. Pseudomonas anguilliseptica as a pathogen of salmonid fish in Finland. *Diseases of aquatic organisms,* 8**,** 13-19.

WIKLUND, T. & BYLUND, G. 1993. Skin ulcer disease of flounder Platichthys flesus in the northern Baltic Sea. *Diseases of Aquatic Organisms,* 17**,** 165-174.

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.

WAAGBØ, R., ESPE, M., HAMRE, K. & LIE, Ø. 2001. *Fiskeernæring*, Kystnæringen.

WAAGBØ, R., REMØ, S., HAMADI, M., JONASSEN, T., 2016. Analyser av rognkjeks med katarakt. *Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES)*.

WAATEVIK, E. Innledning og oversikt. Rensefiskkonfernasen 2017, 2017.

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.

ZHANG, Y.-A., SALINAS, I. & SUNYER, J. O. 2011. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish & shellfish immunology,* 31**,** 627-634.