

Innehållsförteckning

Inledning	s 3
Bakgrund	s 3
<i>Fiskens utveckling</i>	s 3
<u>Att leva i vatten</u>	s 3
<i>Nervsystemet</i>	s 4
<i>Huden</i>	s 4
<i>Vad är en parr?</i>	s 4
<i>Hantering och stress</i>	s 5
<i>Inflammation och smärta</i>	s 5
<u>Prostaglandinsyntes</u>	s 5
<u>Cyklooxygenas</u>	s 6
<u>Bradykininaktivering</u>	s 6
<u>Adherensbildning</u>	s 6
<i>Immobilisering av fisk</i>	s 6
<u>Eugenol</u>	s 7
<u>Isoeugenol</u>	s 7
<u>Benzocain</u>	s 7
Material och metoder	s 8
Metoder för mätning av foderintag	s 8
<i>Vägningsmetoden</i>	s 8
<i>Resultat</i>	s 8
<i>Splitmetoden</i>	s 9
<i>Resultat</i>	s 9
<i>Slutsatser</i>	s 9
Vaccinationsförsöket	s 10
<i>Försöksuppläggning</i>	s 10
<i>Vaccinationsförfarande</i>	s 11
<i>Mätning av adherensbildning</i>	s 11
Genomförande	s 12
Resultat	s 12
<i>Foderintag</i>	s 12
<u>Kontrollgruppen</u>	s 12

<u>Svältgruppen</u>	s 13
<u>Fodergruppen</u>	s 13
<u>Aqui-S™-grupp 1</u>	s 13
<u>Aqui-S™-grupp 2</u>	s 14
<i>Adherensbildning</i>	s 15
<u>Kontrollgruppen</u>	s 15
<u>Svältgruppen</u>	s 15
<u>Fodergruppen</u>	s 15
<u>Aqui-S™-grupp 1</u>	s 15
Jämförelse mellan grupperna	s 16
<i>Foderintag</i>	s 16
<u>Dag -9 till -3</u>	s 16
<u>Dag -2 och -1</u>	s 16
<u>Dag 0-3</u>	s 16
<u>Dag 4-13</u>	s 16
<u>Dag 14-26</u>	s 16
<i>Adherensbildning</i>	s 17
Diskussion	s 17
Sammanfattning	s 19
Summary	s 20
Tack	s 21
Referenslista	s 21

Inledning

Med sviktande fångster och ökande världsbefolkning ökar betydelsen av odlad fisk. Globalt sett är redan 25 % av all matfisk odlad. Svenskar äter mest odlad lax per capita i världen, vilket visar att fisk är ett viktigt produktionsdjur för oss trots att odlingsnäringen inte är särskilt stor i Sverige.

Alla djuretiska regler och lagar gäller även för fisk. Trots detta är smärtlindring ett eftersatt område inom fiskerinäringen. Fiskens stela huvud och avsaknad av ögonlock och ljudorgan gör att den inte har någon möjlighet att med mimik eller ljud visa smärta, även om smärtsystemet är i princip detsamma som hos oss människor (*Brown, 1993*). Avsaknaden av mimik och det faktum att det är ett kallblodigt, lägre stående djur kan medföra att många människor inte känner empati för fiskar, och kanske inte uppfattar att de kan känna smärta.

Vaccinering av fisk kan förmodas framkalla både stress och smärta, eftersom fisken äter mycket dåligt dagarna efter vaccinering. Ätandet återupptas omkring dag tre, men det kan ta mer än två veckor innan fisken äter normalt igen (*Oppedal et al, 2000*). Detta påverkar starkt fiskens tillväxt och därmed också produktionen. En laxparr som väger ca 25-50 g stickvaccineras i buken (intraperitonealt) med oljebaserade vacciner. Denna dos (0,1 ml) motsvarar en injektion av ca 3 dl hos en människa på 75 kg. För att immobilisera fisken används en hög dos lokalanestesimedel i vattnet och medlet tas därmed upp i blodet via gälarna, vilket ger en generell muskelavslappande effekt. Tidigare försök har visat att ett hypnotikum i kombination med muskelavslappande medel förkortar tiden innan fisken äter normalt, men foderintaget är fortfarande mycket lågt 1-3 dagar efter vaccinering (*Oppedal et al, 2000*). Det är troligt att inte bara injektionen som sådan utan också vaccinet och/eller lösningsmedlet påverkar fiskens välbefinnande. Oljebaserade vacciner framkallar som regel bukhinneinflammation, ofta med adherenser som följd. Vattenbaserade vacciner ger dock inte lika stark immunologisk effekt och är inte ett bra alternativ. För att kunna kombinera en fullgod vaccinering med minimalt obehag och stress för fisken är smärtlindring ytterst angeläget. Genom att fisken återhämtar sig bättre förbättras också produktionen och förlusterna minskar. Målet med studien är att utröna om vi kan minska fiskens lidande efter vaccinering.

Bakgrund

Fiskens utveckling

För många miljoner år sedan började fiskar ta sig upp på land. Ur dessa fiskar utvecklades de landlevande vertebraterna. Vi bör dock inte se på fisken som en primitiv förfader, utan som ett djur vi delar förfader med. Fiskar är mer primitiva än oss, men de har inte undgått evolutionen och många fiskarter har utvecklat avancerade system för att passa in i sina nischer. Mer än 90 % av nu levande fiskarter tillhör klassen Osteichthyes – benfiskar. Klassen delas upp i två grupper – mjukstrålfeniga och taggstrålfeniga fiskar. Mjukstrålfeniga fiskar anses mer primitiva, och hit hör bl.a. laxen (*Brown, 1993*).

Att leva i vatten innebär en helt annan utmaning än att leva på land. I vattnet är det större jon- och osmotiska utmaningar och mikrober sprids mycket lätt över stora avstånd. Fisken är ett kallblodigt djur, och de flesta arterna reglerar sin kroppstemperatur passivt med vattnets temperatur. Detta innebär att fisken håller samma temperatur som sin omgivning och är mycket känslig för snabba temperaturändringar och även andra miljöförändringar. Trots att fiskar och människor har så olika förutsättningar liknar ändå de flesta av fiskens organsystem våra (*Brown, 1993*).

Nervsystemet

Nervsystemet har samma basala byggnad som hos högre vertebrater med centralt, perifert och autonomt nervsystem. Hjärna och ryggmärg täcks dock bara av en hinna. Hjärnans dominerande del är mesencephalon (ffa de optiska loberna), och cerebrum är liten (se fig. 1). Ett tvärsnitt av ryggmärgen visar en grå substans formad som ett upp och nervänt Y. Det finns alltså ett dorsalthorn och två ventrolaterala horn. Motoriska och sensoriska neuron kopplas om i alla tre hornen, och det finns alltså ingen uppdelning dorsalthorn/sensoriska neuron, ventralhorn/motoriska neuron som hos oss. Hos bl.a. salmonider ökar också antalet neuron med kroppens tillväxt. En grupp mycket stora axoner, s.k. Mauthneraxon, löper från märgen precis under "Y:ets" förgrening och ventralt om centralkanalerna. Excitering av dessa neuron orsakar en kraftig rörelse av stjärtfenan, eller "Mauthner-initiated startle response". Dessa neuron saknar motsvarighet hos högre vertebrater. Hos högre teleoster avslutas ryggmärgen i urofysen, ett endokrint organ.

Hos fisk har man inte hittat någon analog till primaternas specifika smärtledningsbanor, utan fibersystemet verkar vara mer diffust. Spinocervicala, spinoretikulära och spino-tektala banor kan bära smärtsignaler, men ingen specifik bana verkar vara nödvändig för smärtöverföring. Stimuli som orsakar smärta hos oss behöver inte göra det hos fisk och tvärtom (Brown, 1993).

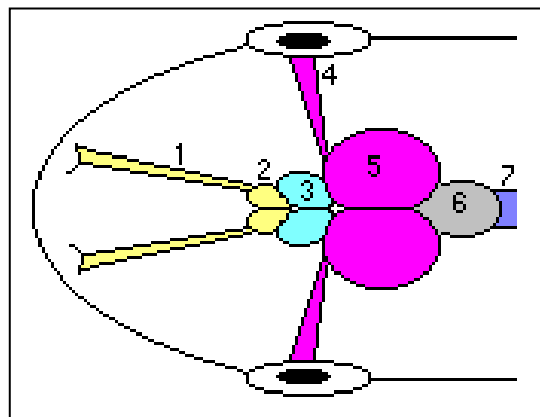


Fig. 1: Principskiss över fiskens hjärna. 1. luktnerver, 2. luktbulberna, 3. cerebrum (storhjärnan), 4. synnerver, 5. optiska loberna, 6. cerebellum (lillhjärnan), 7. förlängda märgen. Hjärnans storlek är i bilden överdriven

Huden

Huden utgör fiskens primära försvar utåt. Dels är den en osmotisk barriär, dels en barriär mot sjukdomar. Ytterst finns ett *slemskikt*. Här finns specifika antikroppar, lysozymer och fettsyror, vilka har en viss skyddande effekt. Kemikalier i slemmet har baktericid och fungicid effekt. Slemmet har också en osmoregulatorisk effekt (minskad permeabilitet), reducerar friktionen när fisken rör sig och transporterar bort mikroorganismer och irritanter när det släpper fiskens hud. Skador i slemskiktet, t ex på grund av hantering, lämnar huden oskyddad mot omgivningen. *Epidermis* består av oförhornat plattepitel. Tjockleken beror bl.a. på ålder och art. Om fisken får ett sår kan de basala cellerna snabbt och oberoende av temperatur migrera över sårytan och täcka denna med ett cellskikt. Därefter läks såret underifrån, en process som är temperaturberoende. Bägarceller producerar och frisätter slem till ytan. *Dermis* har två skikt, ett med lös bindväv där mastceller, pigmentceller och fjäll sitter, och ett tätt kollagenskikt som ger huden styrka. *Hypodermis* är ett kärlrikt fettlager som håller ihop huden med underliggande vävnad. Patogener som penetrerat huden, och den inflammation dessa orsakar sprids lätt genom detta luckra lager (Brown, 1993).

Vad är en parr?

Parr eller stirr kallas laxungen från 2-3 veckors ålder, då gulesäcken resorberats, till dess att smoltifieringsprocessen (anpassning till ett liv i saltvatten) börjar. Parrperioden varar 1-8 år i naturen, beroende på bl.a. näringstillgång och temperatur. Om parren är minst 8-10 cm på hösten, börjar smoltifieringen kommande vår. I odlingar, där tillväxten är acce-

lererad och man kan använda ljusterapi, sker smoltifiering mellan 1/2-2 års ålder (Hansen, 1998). Under parrperioden sker vaccinering av fisken i odlingsanläggningar.

Hantering och stress

Fisk är mycket känslig för förändringar i omgivningen. All hantering av fisk kan förmodas orsaka stress av olika styrka, beroende på hanteringens omfattning i tid, intensitet samt om smärta framkallas. När fisken stressas frisätts katekolaminer och steroidhormoner till blodet. Katekolaminernas verkan är snabb och kortvarig, medan steroidhormonerna, framför allt kortisol, har långvariga effekter även vid låga doser (Ross & Ross 1999). Ju längre eller ju intensivare stress, desto större blir kortisolsvaret (Iwama et al, 1997). Fisk kan också vänjas vid hantering genom att man utsätter dem för mild stress (viss hantering) under en längre tid (Iwama et al, 1997). Stress kan orsaka akuta eller mer kroniska fysiologiska/biokemiska rubbningar. Till akuta förändringar hör ökad syrekonsumtion, ökat energibehov och beteendeförändringar. Exempel på ett beteende som reaktion på akut stress är flykt, som syftar till att öka chansen för överlevnad (Iwama et al, 1997). Till kroniska rubbningar hör minskad tillväxt och ett sänkt immunförsvar. Vaccination är stressande för fisken, dels på grund av hantering utan hypnotikum/analgetikum, dels på grund av den framkallade smärtan vid påföljande inflammation. Praxis är att svälta fisken ett par dagar innan vaccinering för att minska nedsmutsning av vattnet pga. defekation och minimera ökningen i syrekonsumtion. Detta ger mindre rengöringsarbete och mindre åtgång av ren syrgas på tub, och är alltså praktiska åtgärder.

Inflammation och smärta

Smärta medieras av bl.a. prostaglandiner och bradykinin, ämnen som också är aktiva i den inflammatoriska processen. Vid akut inflammation frisätts prostaglandiner (PG) från den skadade vävnaden, lokala blodkärl samt mastceller. Prostaglandinerna, ffa PGE₂, PGI₂ och PGD₂ arbetar synergistiskt med bradykinin och histamin, vilket orsakar en kraftig vasodilatation och ökad kärlpermeabilitet med lokalt ökat blodflöde och rodnad som följd. Vid kronisk inflammation frisätts prostaglandin från makrofager och monocyter. Prostaglandiner stimulerar vissa inflammatoriska processer, men kan hämma andra genom att minska aktiviteten hos vissa inflammatoriska celler. PGE₂ hämmar lysozymfrisättning hos neutrofiler och histaminfrisättning hos mastceller. Aktivering av lymfocyter och makrofager, samt frisättning av vissa cytokiner kan också minskas av PGE₂ (Rang et al., 1999).

Prostaglandiner deltar också i bevarandet av basala fysiologiska funktioner (blodtryck etc.). PGE₂ skyddar magslemhinnan genom att öka syntes och frisättning av bikarbonat och mucus, samt minska produktionen av saltsyra. Vid svält ökar prostaglandinhalten i blodet hos däggdjur (Kindahl, H., *personlig kommunikation*).

Prostaglandiner finns i stora mängder i nervsystemet och verkar på nervändarna dels genom att stimulera kalciumanvändning (Goth 1981; Rang et al., 1999), dels genom att inhibera kaliumjonkanaler (Rang et al., 1999). Detta ger en sensibilisering av nervändarna, och sker lokalt i vävnaden vid inflammatoriska processer. Prostaglandinerna orsakar inte smärta i sig själva, utan ökar kraftigt effekterna hos ämnena bradykinin och serotonin. Genom att bradykinin kan stimulera frisättning av prostaglandiner, har ämnet en kraftig självsensitiserande effekt på nervfibrerna (Rang et al., 1999).

Prostaglandinsyntes: Prostaglandiner bildas ur arakidonsyra. Först bildas endoperoxiden prostaglandin G₂ via två steg, där det första steget är en lipidperoxidation och det andra en isomerisering och tillägg av en hydroperoxygrupp (Rang et al., 1999). Enzymet som styr processen är cyklooxygenas (COX). Prostaglandin G₂ sönderfaller snart till prostaglandin

H₂ med hjälp av enzymet peroxidasa. Prostaglandin H₂ omvandlas dels till andra prostaglandiner, dels till tromboxaner och prostacykliner. De två sistnämnda är aktiva i blodplättsaggregering resp. hämning av blodkroppssaggregering. Arakidonsyra kan också omvandlas till inflammatoriskt aktiva leukotriener (Goth, 1981).

Cyklooxigenas finns i två former, COX-1, som syntetiserar prostaglandiner som ingår i bevarandet av kroppens homeostas, samt COX-2, som aktiveras vid inflammatoriska processer (Rang et al, 1999). NSAIDs - non-steroidal antiinflammatory drugs (t.ex. Magnecyl) lindrar inflammatorisk smärta genom hämning av cyklooxigenas. Dessa läkemedel är inte helt COX-2-selektiva, utan COX-1 hämmas också i viss utsträckning, vilket ger störningar i bl.a. magsäckens slemhinneskydd, ibland med magsår som följd (Rang et al., 1999).

Bradykininaktivering sker via klyvning av aktiva kininer från ett större protein i plasman. Bradykinin aktiveras vid bl.a. inflammation, trauma, värme och vid endotoxin. Bradykinin kan orsaka frisättning av prostaglandiner från njuren och katekolaminer från binjuremärget (Goth, 1981).

Adherensbildning: Inflammation i samband med vaccination ger också upphov till adherensbildning. Adherenser innebär att olika bukorgan sitter ihop med varandra eller med bukväggen via fibrösa bildningar i peritoneum. Om man rensar ut större fiskars inälvor kan man eventuellt också se svartaktiga klumpar mot bukväggen. Att klumparna är svarta beror på melanininlagring. En högre vattentemperatur vid vaccinering leder till fler sammanväxningar, speciellt i den akuta fasen efter vaccinering (Berg, A., *personlig kommunikation*). Vaccinet kapslas ofta in och deponeras långsamt under en längre tid, vilket gör att adherenserna förändras med tiden. Det kan vara så att kroppen vid högre temperaturer inte hinner med att kapsla in vaccinet pga. högre reaktionshastigheter i inflammationsförloppet, vilket skulle leda till en kraftigare inflammation och kraftigare adherensbildning.

Immobilisering av fisk

De medel som används för att göra fisk hanterbar är främst medel med lokalanestetisk verkan på människor. Om lokalanestetiska medel kommer ut i blodet kan de nå in i CNS. Detta orsakar CNS-stimulering som först ger oro, tremor, kramper, och andningsstimulering. Möjligen beror detta på en selektiv depression i inhiberande neuroner. Efter den centrala stimuleringen följer depression med bl.a. sänkt andningsfrekvens, och överdosering leder lätt till döden. Kardiovaskulära effekter är vasodilatation och sänkt hjärtfrekvens (Rang et al., 1999). Hos fisk ges inte anestesi lokalt, utan medlet löses i vattnet och ges till fisken som inhalationsanestesi. Medlet tas då upp via gälarnas artärer och förs snabbt till centrala nervsystemet, se fig. 2 (Ross & Ross, 1999). Det är därför troligt att vi får dessa CNS-effekter hos fisk. När fisken förs över till friskt vatten utsöndras medlet och dess metaboliter över gälarna och till en liten del över huden (Ross & Ross, 1999).

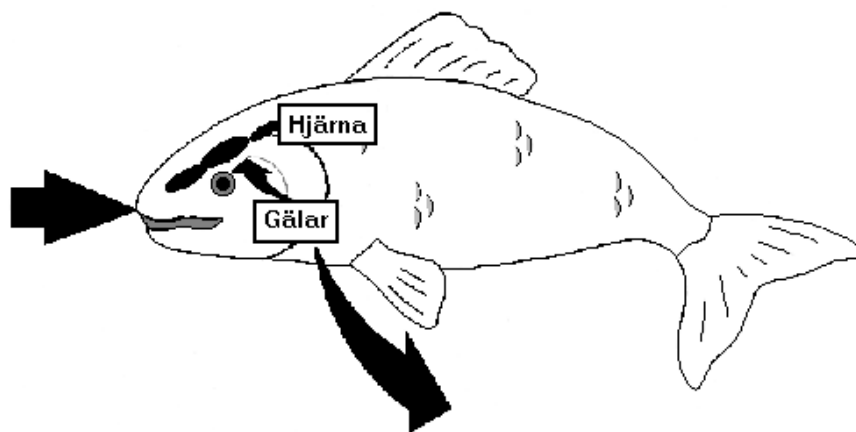


Fig. 2: Princip för inhalationsanestesi på fisk. (Modifierad från Ross & Ross, 1999).

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) är ett ämne med hög fettlöslighet. In vitro har eugenol i små mängder ($\leq 100\mu\text{M}$ eugenol till $100\mu\text{M}$ arakidonsyra) visat sig stimulera prostaglandinsyntesen genom att fungera som co-substrat till peroxidase. När förhållandet eugenol:arakidonsyra överstiger 1 börjar eugenol istället hämma syntesen (Thompson and Elving, 1989). Eugenol hämmar prostaglandinsyntesen genom att hämma enzymet cyklooxygenas (Keene et al 1998). Hämmningen är troligtvis kompetitiv, dvs eugenol och arakidonsyra tävlar om bindningen till enzymet. Samma förhållande har visats för några andra fenoler, t ex fenol, guaiacol och acetaminofen (Thompson and Elving, 1989). Hämmningen av prostaglandinsyntesen pekar på en analgetisk verkan. Eugenol hämmar lipidperoxidation och xantinoxidas i xantin-xantinoxidassystemet (Rajakumar & Rao, 1993). Den selektiva permeabiliteten hos cellmembranet ändras via påverkan av dess fysiska egenskaper. Denna påverkan möjliggörs av att eugenol har en hydrofil och en hydrofob del. Eugenol verkar också antiseptiskt (<http://www.biam2.org/www/Sub1637.html>). Eugenol används av tandläkare för lokalbedövning. Eugenol har eventuellt också en effekt liknande curares (Brodin and Roed, 1984). Curare blockerar acetylkolinreceptorerna i muskeländplattorna, där signalerna från de motoriska neuronerna överförs till muskulaturen. Blockeringen innebär att nervsignalerna inte når fram och muskulaturen förlamas. Övriga nerver påverkas inte av denna blockering, och djuret/människan förblir vid fullt medvetande. Ämnet anses inte vara carcinogent, men är allmänt giftigt och cytotoxiskt. Vid mätningar på människa har man funnit att eugenol snabbt försvinner ur blod/vävnader. Man antar att samma förhållanden gäller för fisk. Eugenols fettlöslighet gör dock att ämnet potentiellt kan lagras i fettväv.

Isoeugenol är den verksamma substansen i AQUI-S™. Ämnets smärtlindrande effekter är inte klarlagda. Det är dock troligt att isoeugenol hämmar prostaglandinsyntesen på samma sätt som eugenol. Isoeugenol har nämligen visat sig vara mer effektiv som hämmare av Fe^{2+} -, Fe^{3+} - och cumenehydroperoxid-inducerad lipidperoxidation än eugenol. Isoeugenol neutraliserar också effektivt de superoxid-anjoner som bildas i xantin-xantinoxidassystemet (Rajakumar & Rao, 1993). Huruvida isoeugenols immobiliserande effekt är anestetisk eller curareliknande är inte utrett. AQUI-S™ används i Nya Zeeland vid slakt av fisk. I Norge är preparatet godkänt för användning i samband med vaccinering av fisk. Inga MRL-värden har fastställts.

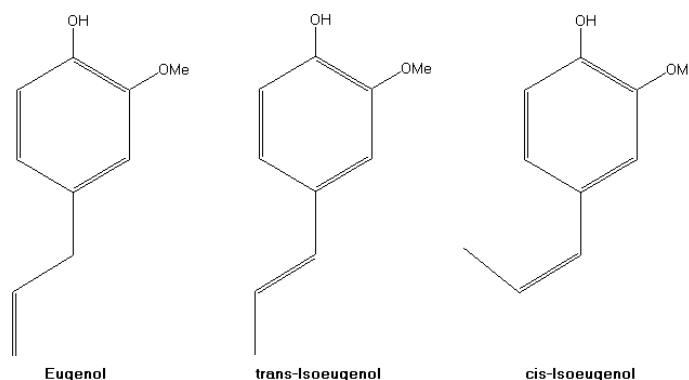


Fig. 3: eugenol och isoeugenol

inte utrett. AQUI-S™ används i Nya Zeeland vid slakt av fisk. I Norge är preparatet godkänt för användning i samband med vaccinering av fisk. Inga MRL-värden har fastställts.

Benzocain är en ester som verkar lokalbedövande hos människor. Benzocain används i stor utsträckning vid hantering av fisk, t ex i samband med vaccinering. Fisk som immobiliseras med benzocain kan visa tecken på stress genom att göra kraftiga försök att behålla balansen under insomning och framför allt uppvaknade. Fisken tar också lång tid på sig för återhämtning (Oppedal et al, 2000).

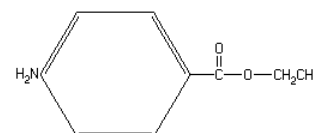


Fig. 4: benzocain

En ökad hematokrit, troligtvis beroende på blodkroppssvullnad har observerats (Olsen et al, 1994). Denna blodkroppssvullnad minskar flödet i gäلكapillärerna, och förlängd exponering leder till hypoxi (Ross & Ross, 1999). Ämnet är mer toxiskt vid högre temperaturer, samtidigt som högre doser krävs för effektivitet,

troligen på grund av snabbare metabolisering i fisken. Vattnets hårdhet, alkalinitet och pH påverkar inte ämnets effektivitet (Brown, 1993).

Material och metoder

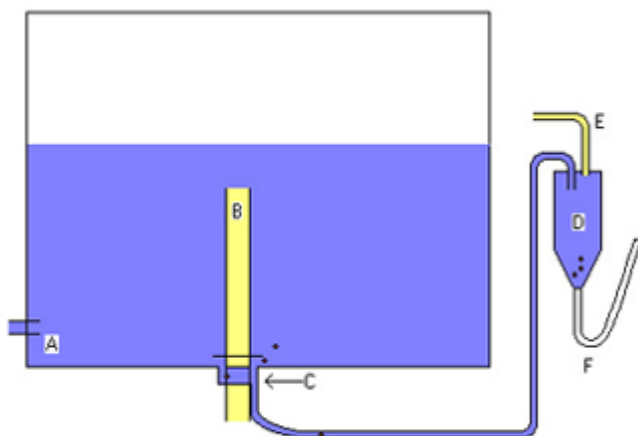
Försöket delades upp i två delar. Under den första delen, innan fisken överförs till karen, utvärderades två metoder för mätning av fiskens foderintag ut. Den bästa metoden skulle sedan användas för att beräkna fiskens foderintag under del två. Den andra delen var ett vaccinationsförsök, där olika metoder för smärtlindring efter vaccination prövades. Foderintaget användes här som indikator på fiskens välbefinnande.

Metoder för mätning av foderintag

Fiskens foderintag beräknas med hjälp av utfodrad mängd foder och mängd spillfoder. För att kunna mäta spillfoder ansluter man en foderuppsamlare till karet, se fig. 5. Denna töms regelbundet inför mätningarna. Till att börja med mätte jag upp 10*100 pellet och vägde dessa. Utifrån detta räknade jag ut medelvikten/pellet, vilken är 0,0115 g (2 mm pellet). Fodermängderna som användes i försöket var 100, 200, 400, 600, 800 och 1000 pellet. För varje fodermängd utfördes tre mätningar.

Vägningsmetoden

Metoden går ut på att väga spillfoder efter att ha torkat det 24 resp. 48 timmar. Man måste då ta hänsyn till att vikt försvinner vid torkning, och oanvänt foder måste också torkas för mätning av torrsubstansinnehåll. Därefter använder man formler för att räkna ut "recovery", dvs. hur stor % av det oanvända fodret man får tillbaka, och sedan hur mycket fisken har ätit. Recoveryvärdet visar procenten torrsubstans man får tillbaka av det outnyttjade fodret (Helland et al 1995). Om inget av pelleten löstes upp skulle alltså recoveryvärdet vara 100 %.



A: inflöde till kar; B: utflöde från kar; C: inflöde till foderuppsamlare; D: foderuppsamlare; E: utflöde från foderuppsamlare; F: slang för foderuppsamling

Fig. 5: kar med foderuppsamlare

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{S_t * S_d}{F_t * F_d} * 100$$

där S_t = spillfoder i tomt kar (g), S_d = % torrsubstans spillfoder
 F_t = foder, lufttorrt i tomt kar (g), F_d = % torrsubstans foder

$$\text{Uppätet foder (g)} = \frac{(F_f * F_d / 100) - (S_f * S_d / R)}{F_d / 100}$$

där F_f = foder givet till fisk (g), S_f = spillfoder från fisk (g), R = recovery

Resultat

Vid vägning av mängden 100 pellet räknade jag den pellet jag fått tillbaka, och såg att bara 69-85 st. av dessa kommit ut i foderuppsamlarna. Ur detta försök räknade jag ut en medelvikt för våt pellet, samt det teoretiska recoveryvärdet, eftersom jag visste exakt hur mycket pellet jag fått tillbaka. Det teoretiska recoveryvärdet, dvs. om jag fått tillbaka all pellet med samma torrsubstanshalter var 78-91 % (se diagram 1). Detta innebär att ca 9-

22 % av pelletens torrs substans försvinner i vattnet genom att pelleten delvis löses upp. I de följande försöken (200-1000 pellet) kunde jag se att jag fick tillbaka mindre vikt än jag beräknat, ca 70-80 % av pålagt foder, vilket gav mig ett recoveryvärde på 60-70 % för de olika mätningarna. Detta värde ligger ca 20 % under det teoretiska värdet (se diagram 1).

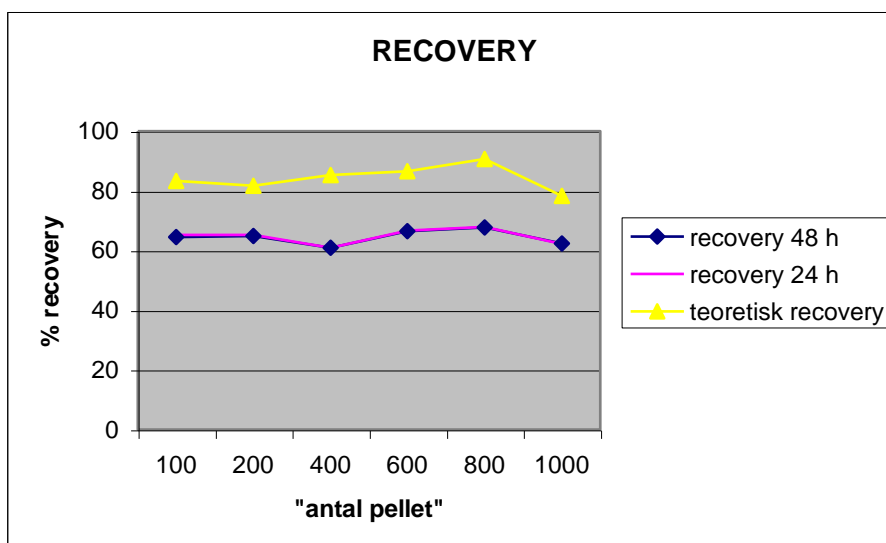


Diagram 1: test av vägningsmetoden. Observera att mätvärdena för 24 h och 48 h är nästan exakt lika

Splitmetoden

Den andra metoden går ut på att räkna överbliven pellet, och sedan använda medelvikten/pellet för att räkna ut hur mycket fisken har ätit. För att räkna pellet används en planktonsplitter, som bygger på att man försöker halvera mängden pellet ett antal gånger för att få en lätt räknad mängd (ca 50-200 st.). För att få antalet överblivna pelletar tar man antalet pellet*2^a, där a är antalet splittningar. Därefter kan man räkna ut vikten av spillfodret.

Resultat: När jag testade splitmetoden fick jag mycket bra resultat, då mätvärdena låg väldigt nära det teoretiska (se diagram 2).

Slutsatser

Eftersom värdena för torrs substans och recovery varierade så kraftigt från gång till gång, och värdena för planktonsplittern var så bra, bestämde jag mig för att använda splitmetoden. På så sätt undvek jag den kraftigt varierande felkällan för hur mycket torrs substans som försvinner. Värdena för vägningsmetoden visade att det fanns en läcka någonstans. För att hitta pelletläckan

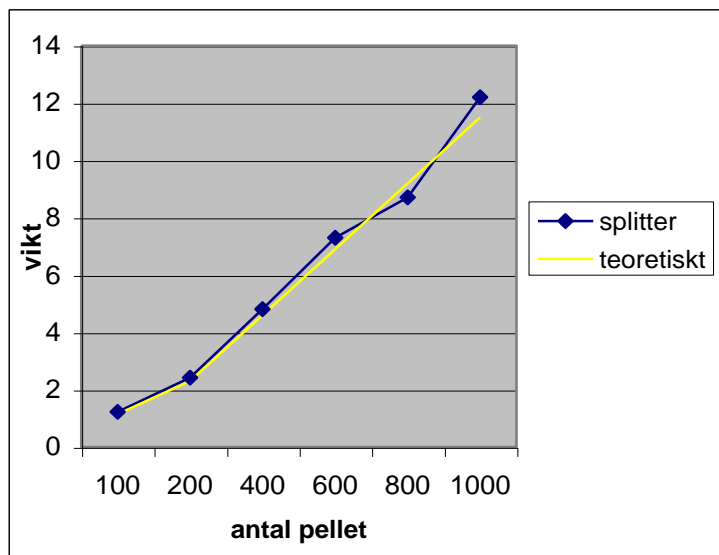


Diagram 2: test av splitmetoden

testades ett antal olika upplägg, bl.a. med två olika typer av höga vattenuttag i karen, nät över vattenuttagen i karen, och slangarna till foderuppsamlarna (se fig.5, F) nere. Med slangarna till foderuppsamlaren nere rinner vattnet hela tiden rakt igenom så att den inte fylls, varvid inget vatten kan gå genom foderuppsamlarens vattenuttag (se fig. 5, E). När

jag testade med ett nytt vattenuttag och nät i karen samt genomflöde i foderuppsamlarna försvann ingen pellet, så det verkade som om det fanns två läckor. När jag satte ett nät för vattenuttaget från foderuppsamlaren fick jag tillbaka en del pellet, så där fanns en läcka. Pellet fastnade i de nya höga vattenuttagen, vilket berodde på att foderautomaterna släppte fodret precis vid uttagen. Detta löstes med hjälp av ett nät så att fodret rutschade ner längre in i karet. Ett av de höga uttagen, rutschkana samt nät för utflödet från foderuppsamlaren blev den slutgiltiga lösningen. På det sättet togs alla felkällor utom osäkerheten för planktonsplittern bort.

Vaccinationsförsöket

Försökuppläggnin

Fisken som användes är Atlantlax, *Salmo salar*. I försöket ingick 14 kar, med 100 (10 små kar á 135 l) resp. 200 (4 stora kar á 290 l) laxparr/kar.

Fisken hade ljus och utfodring hela dygnet, och foderintaget mättes med planktonsplitter (splitmetoden) en gång/dygn. Foderintaget i procent av biomassan användes som ett mått på fiskens välbefinnande. Denna mätmetod användes eftersom fisk minskar sitt foderintag eller slutar äta helt när den mår dåligt. Fiskens aptit är därmed en bra indikator på hur den mår.

Vaccinationsförsöket består två delar:

- En utfodringsdel, där två olika utfodringsmodeller i samband med vaccinering testades. Dels fanns en grupp som svältes (svältgruppen) både före och efter vaccinering, dels fanns en grupp som fodrades genom hela försöket (fodergruppen), se fig. 5. Det fanns också en kontrollgrupp, som rutinvaccinerades, vilket innebär svält i 2 dagar innan vaccinering, och sedan utfodring direkt, se fig. 6.
- En smärtlindringsdel, där fisken svältes före vaccinering och fodrades direkt efter vaccinering, samt fick Aqui-S™ i vattnet under tre dagar efter vaccinering (Aqui-S™grupp 1), se fig. 5. Tio dagar efter vaccinering slaktades fisken i ett kar i gruppen ut tillsammans med ett av karen ur kontrollgruppen och ny fisk sattes in. Dessa två nya kar utgjorde Aqui-S™grupp 2. Dessa fiskar sorterades under Aqui-S™påverkan eftersom vi behövde snabb återhämtning, och fick sedan Aqui-S™ i vattnet under åtta dagar efter vaccinering. Detta delförsök syftade till att utvärdera om Aqui-S™ har smärtlindrande effekt, och om återhämtningstiden kan kortas ner genom administrering av Aqui-S™ i vattnet.

Aqui-S™ med verksam substans isoeugenol, används för anestesi och lätt sedering. För anestesi/immobilisering krävs en dos på 15-25 ml/1000 l vatten (www.Aqui-S.com). För lätt sedering använder Matre Havbruksstasjon 3,5-4 ml Aqui-S™/1000 l vatten. I det här försöket testades Aqui-S™ som smärtlindrare. I försöket användes 25 % av sistnämnda dos, dvs 1 ml/ 1000 l både för en första stötdos och underhåll. Denna dos blandas ut i ljummet vatten innan den tillsätts till karen. För underhållet användes peristaltiska pumpar för en jämn tillsats av Aqui-S™ till karen. Genom att se på vattenflöde och hur mycket vätska pumparna kunde mata ut per timme beräknades sedan koncentrationen på den Aqui-S™blandning som behövde pumpas ut i karen på tio timmar. Grunddosen låg på 0,135 ml/kar (litet kar, 135 l) resp. 2,9 ml (stort kar, 290 l). Underhållsdosen som gavs för att hålla Aqui-S™nivån konstant på 1ml/1000 l vatten var 0,6 ml/timme till vart och ett av de små karen (vattenflöde 600 l/timme), och 0,3 ml/timme till det stora karet (vattenflöde 300 l/timme).

Kontrollgruppen och Aqui-S™grupp 1 bestod av vardera fyra kar (ett stort kar och tre små), medan svältgruppen och fodergruppen bestod av vardera tre kar (ett stort och två

små). Fisken i Aqui-S™ grupp 2 sattes i de två stora karen från kontrollgruppen och Aqui-S™grupp 1 sedan fisken i dessa kar avlivats. Kontrollgruppens, svältgruppens, fodergruppens och Aqui-S™grupp 1's återhämtning efter vaccinering jämfördes statistiskt efter avslutat försök. För den statistiska analysen användes statistikprogrammet SAS (version 6:12 för PC), med metoden Glm (ANOVA för obalanserade data) och post hoc F-test. Aqui-S™ grupp 2 togs inte med i jämförelsen då denna grupps vaccinering var förskjutet i tiden med övriga gruppers vaccinering.

Fisken i elva kar svältes i 2 dagar innan vaccinering. Efter vaccinering sattes fyra av dessa kar på utfodring direkt. Detta är normalt förfarande, och dessa kar utgjorde kontrollgruppen. I fyra av karen droppades Aqui-S™ kontinuerligt med hjälp av en pump under tre dygn efter vaccinering, och fisken utfodrades direkt efter vaccinering. Genom att jämföra Aqui-S™-gruppen med kontrollgruppen får vi veta om analgesi kan minska återhämtningstiden då fisken har tillgång till foder. I övriga tre kar svältes fisken i ytterligare tre dygn, och började sedan utfodras då fisken normalt återupptar ätande. Detta gjordes för att se om

en tom tarm kan minska fiskens smärtor och därmed minska tiden till dess att fisken åter har normal foderförbrukning.

Fisken i tre kar utfodrades genom hela försöket för att se om en full tarm i samband med vaccinering påverkar välbefinnandet.

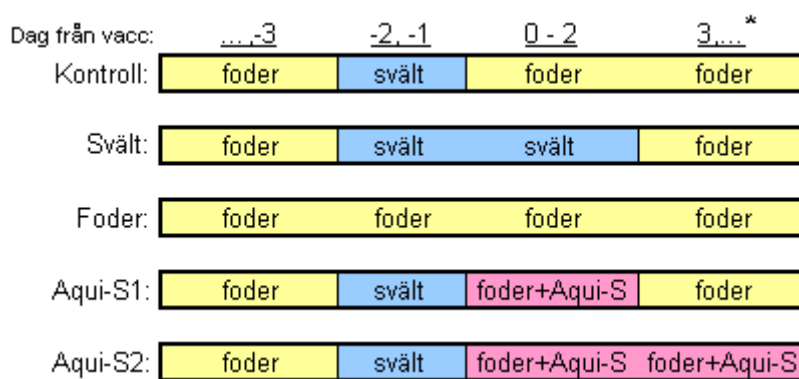


Fig. 6: Flödesschema för vaccinationsförsöket. * För Aqui-S™grupp 2 dag 3-8, övriga grupper dag 3-27

Vaccinationsförfarande

Vid vaccinering immobiliserades fisken med benzocain.

Vaccinet som användes var NORVAX® COMPACT 6 vet., verksamt mot furunkulos, kallvattenvibrios, vibrios, vintersår och infektiös pankreasnekros. Injektionsdosen var 0,1 ml. Denna dos används oavsett fiskens storlek, och fisken väger vanligtvis ca 25-50 g vid vaccinering.

Mätning av adherensbildning

Fyra veckor efter vaccinering plockades 7 fiskar per kar ut för att dissekeras med avseende på adherenser (akut adherensbild). Ytterligare sju fiskar per kar plockades ut och fenklipptes (ID-märkning) under Aqui-S™påverkan. Denna fisk släpptes sedan i ett gemensamt kar för att man fyra veckor senare skulle kunna göra en ny dissektion (mer kronisk adherensbild).

Dissektionen gjordes för att se om vi har påverkat bildningen av adherenser och därmed inflammationsprocessen genom att svälta/utfodra fisken eller genom att ge smärtlindring. Adherenser graderas enligt Speilbergs skala med siffrorna 0-6, där 0 innebär avsaknad av adherenser, och 6 utbredda adherenser, ofta med kraftig melanininlagring, och där viscera inte kan plockas ut utan att förstöra fileén (Midtlyng et al, 1996). Man tittar också på var adherenserna sitter i buken, som då delas in i zonerna A, B och C (Berg, A., personlig kommunikation), se fig.7. För statistik används dataprogrammet Statistica med ANOVA variansanalys och post hoc Duncan, SNK och Mann-Whitney U-test.

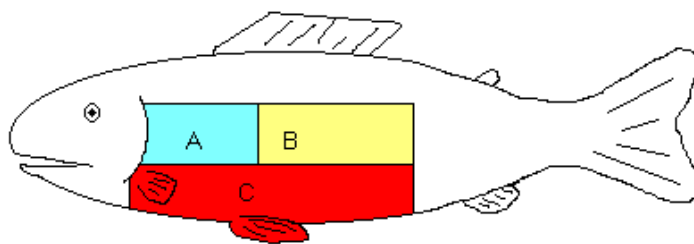


Fig.7: Zonindelning av buken vid mätning av adherenser

Genomförande

Karen grupperades som 5, 6, 7 och 11 (kontrollgruppen), 8, 9, 10 och 12 (Aqui-S™grupp 1), 3, 4 och 13 (svältgruppen), 1, 2 och 14 (fodergruppen) efter sina placeringar i laboratoriet. Nio dagar innan vaccinering överfördes fisken till försökskaren för att hinna adaptas till den nya miljön och en ny foderstorlek. Från sex kar med familjegrupeer sorterades 1980 fiskar (330*6) ut efter storlek och fördes över i ett gemensamt kar för att de skulle blanda sig, så att ingen familjegrupeer skulle bli överrepresenterad i något kar. Storlekssortering var nödvändig för att få fram fisk stor nog att vaccineras. Ur det stora karet räknades sedan 110*10 fisk, biomassan vägdes in och fisken fördes över till individlaboratoriets kar 1-10 (små). Därefter räknades 220*4 fisk, vägdes in och överfördes till kar 11-14 (stora). Den genomsnittliga vikten för fisken var 19 g. Räkning och invägning av biomassa gjordes av en person utanför försöket. Vägningen gjordes i invägda hinkar med vatten (vi vägde alltså inte fiskens torrsvikt), så viss avvikelse från den exakta vikten kan ha förekommit. När fisken förts över till de nya karen var det en del som visade tecken på utmattning (förlorad jämvikt). Då vattentillförseln i karen var god och syrehalten bra, hämtade sig fisken snabbt. Eftersom flyttning och byte till större pellet innebär stress, räknar man med minst ett par dagar för fullständig återhämtning. Detta ses på att foderintaget ökar från minimal nivå första dagen till normal (ca 1,6-2,0 % av biomassan).

Sju dagar efter flytten sattes elva av karen på svält (kontrollgruppen, Aqui-S™grupp 1, svältgruppen). Fodergruppen sattes inte på svält, utan utfodringen fortsatte som vanligt. Vaccineringen skedde två dagar senare, dvs. nio dagar efter flytten. Fisken håvades över i en bytta med syresatt vatten och benzocain. Därifrån håvades fisken i omgångar till en mindre bytta där de plockades en och en för vaccinering. Direkt därefter släpptes de ner i karen för att vakna upp. En del fisk reagerade på sticket med en stjärtrörelse. Efter ca 15 minuter i friskt vatten kontrollerades fisken, och de hade då hämtat sig från sederingen och simmade normalt. Eftersom det var nästan 2000 fiskar som skulle vaccineras av en vaccinator tog det ca fyra timmar innan alla fiskarna var vaccinerade.

Fisken i Aqui-S™grupp 1 fick ca en timme efter vaccinering Aqui-S™ i karen.

Resultat

Foderintag

Kontrollgruppen: Dagen efter vaccinering åt fisken ganska mycket, men sedan sjönk foderintaget drastiskt under två dagar. På fjärde dagen hade intaget stabiliserats, och sedan ökade de från och med dag fem efter vaccinering (se diagram 3). Gruppen var ifatt svältgruppen och fodergruppen dag 9. Ett kar sattes tillsammans med ett kar från Aqui-S™ grupp 1 på Aqui-S™behandling dag fem (se nedan under Aqui-S™grupp 1, stycke 2), och finns inte medräknad i gruppens medelvärde från och med denna dag.

Svältgruppen: Svälten avbröts dag tre. Fisken åt mycket under första utfodringsdagen, men sjönk dagen efter (dag fyra efter vaccinering). Svackan blev dock inte lika djup som för de övriga grupperna, och dag fem vände kurvan uppåt. Gruppen fortsatte att öka i foderintag och låg strax under foderintaget för fodergruppen till dag nio då grupperna var lika (se diagram 3).

Fodergruppen: Gruppen ökade ytterligare något i foderförbrukning då övriga grupper sattes på svält, vilket visar att fisken inte riktigt återhämtat sig från flytten innan svälten påbörjades. Gruppen sjönk nästan till noll i foderintag vaccinationsdagen. Därefter följde gruppen kontrollgruppen ett par dagar, för att dag fem dra ifrån med högre foderintag. Dag nio kom och svältgruppen ifatt, och dag 12 kom kontrollgruppen ifatt (se diagram 3).

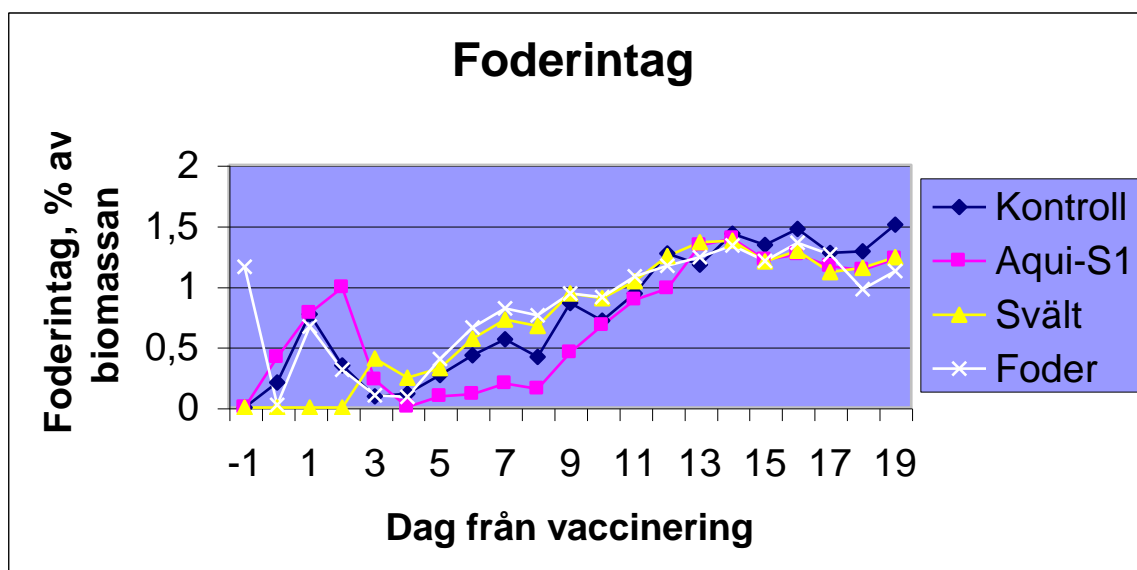


Diagram 3: Foderintag efter vaccinering. Dag 0 = vaccinering, värdet för foderintag denna dag gäller 10 h utfodring, övriga dagar 24 h utfodring

Aqui-S™grupp 1: Fyra timmar efter påbörjad behandling kontrollerades medicinpumparna. En del fisk i gruppen (ca 4-5 %) visade då stressymptom och simmade i vinkel mot ytan samt gjorde en del mindre hopp. De flesta av fiskarna betedde sig normalt och höll sig lugnt simmande nere vid botten. Morgonen efter var fisken mindre stressad och hungrig. Då de övriga grupperna sjönk dag två fortsatte gruppen att öka i foderintag. När behandlingen avbröts dag tre sjönk dock foderintaget snabbt, och dag fyra var foderintaget noll. Dag fem började de äta igen, men ökningen var inte lika snabb som i de andra grupperna (se diagram 3). Gruppen hade initialt en långsam återhämtningstakt och kom ifatt kontrollgruppen dag 10 och svält- och fodergrupperna dag 12.

Att gruppen sjönk i foderintag när Aqui-S™behandlingen togs bort visade att vi inte kommit förbi den akuta smärt-/inflammationsfasen, och medicineringen avbröts alltså för tidigt. Dag fem efter vaccinering sattes därför ett kar på ny Aqui-S™behandling tillsammans med ett kar ur kontrollgruppen för att se om vi kunde ta bort smärtan och öka foderintaget (se diagram 4). Från dag fem finns detta kar inte medräknad i gruppens medelvärde. Karen ökade snabbt i foderintag, men började plana ut dag sju. Dag nio sågs ingen effekt av Aqui-S™ längre. Dag tio avlivades fisken i dessa två kar och ny sattes in (Aqui-S™grupp 2, se nedan).

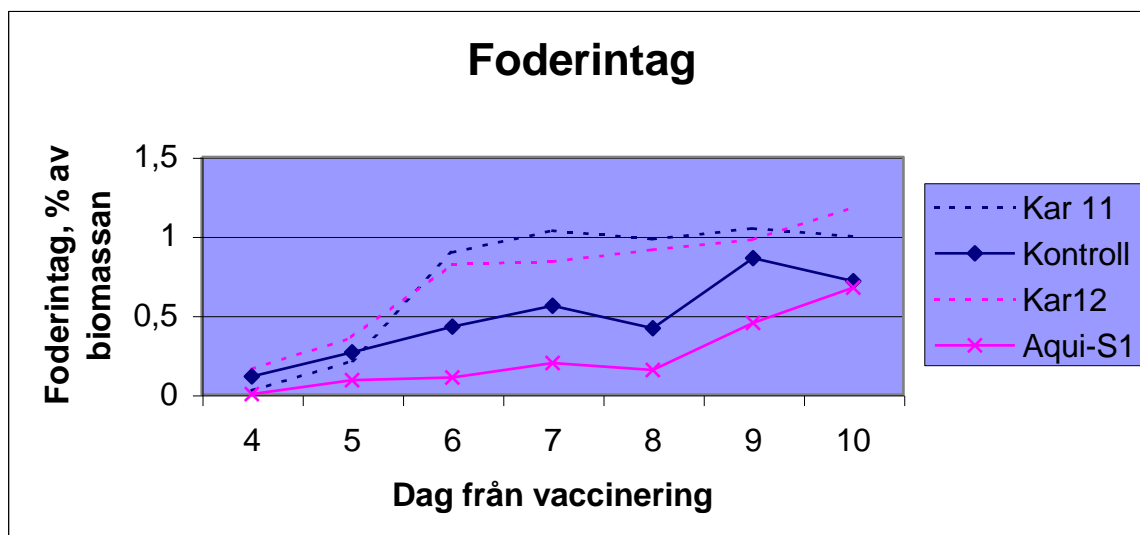


Diagram 4: Foderintag hos Kar 11 & 12, jämfört med kontrollgruppen & Aqwi-STMgrupp 1 efter vaccinering. Dag 0 = vaccinering. Dag 5 sattes andra omgången Aqwi-STMbehandling in. Från denna dag räknas kar 11 & 12 ej med i respektive gruppmedelvärde.

Aqwi-STM-grupp 2: Den nya fisken som sattes in (kar 15 resp. kar 16) blev en ny försöksgrupp. Fisken sorterades under Aqwi-STMpåverkan.

Återhämtningen gick snabbare än för de tidigare grupperna, och dagen innan svält var foderintaget mycket högre än motsvarande dag för övriga kar. Denna fisk var något större (23 g) än de tidigare uttagna grupperna. Detta berodde på att fisken hunnit växa sedan förra sorteringen 19 dagar tidigare. Att sortera ner i storlek hade varit möjligt, men det hade också inneburit mycket stress för fisken, och det krävdes snabb återhämtning (minimal stress) och vaccinering för att hinna med denna extra grupp. Efter vaccinering sattes karen på Aqwi-STMbehandling med samma dosering som tidigare försöksgrupp. Här avslutades dock inte behandlingen dag tre, utan fortsattes till dag åtta då försöket avslutades. Foderintaget efter vaccinering varierade stort mellan de två karen, när kar 15 dök dag två efter vaccinering fortsatte kar 16 uppåt, och förhållandet var motsatt dag sex. Medelvärdet för foderintag var dock klart bättre än för kontroll- och Aqwi-STMgrupp 1 under motsvarande tidsperiod.

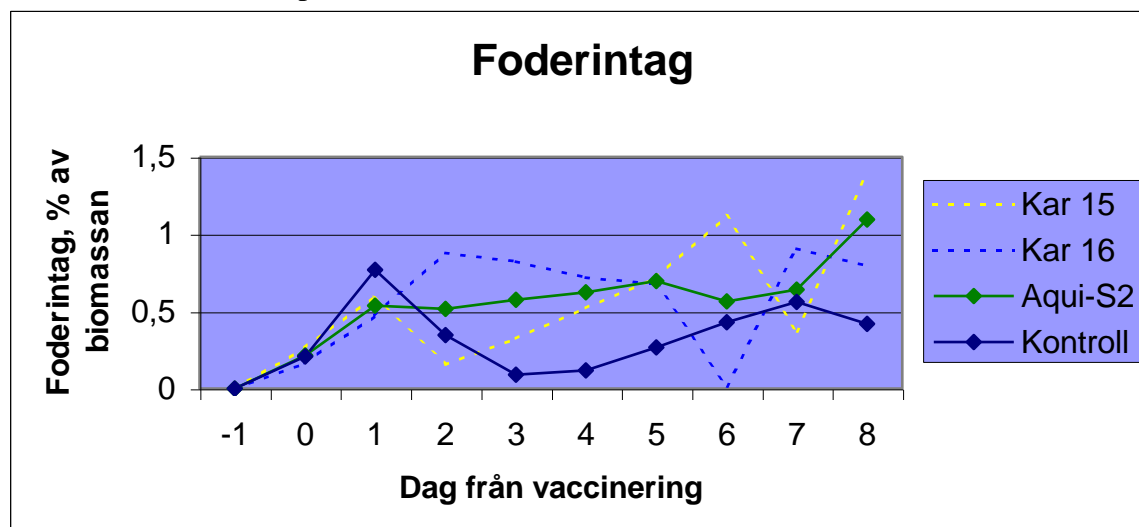


Diagram 5: Foderintag för kar 15, kar 16 samt medel för de två karen (Aqwi-S2) jämfört med kontrollgruppens foderintag för motsvarande period. Dag 0 = vaccinering

Adherensbildning

Totalt dissekerades 21 fiskar per försöksgrupp fyra veckor efter vaccinering. Den dissektion som skulle ske efter åtta veckor kunde inte utföras då fenklippningen av fiskarna blivit fel, och grupperna inte kunde urskiljas. Resultaten gäller därför enbart den akuta adherensbilden.

Kontrollgruppen: En hane var könsmogen, en s.k. dvärghane. Tre fiskar hade adherenser av grad 1, femton fiskar hade adherenser av grad 2 och tre fiskar adherenser av grad 3 (se diagram 6). Utbredningen var fördelad över alla tre zonerna A, B och C, zonerna A och B, zonerna B och C eller bara zonen C. Medelvärde för adherensbildningarna var 2,0.

Svältgruppen: Tre fiskar hade adherenser av grad 1, tretton st. hade adherenser av grad 2 och fem st. hade adherenser av grad 3 (se diagram 6). Utbredningen var fördelad över zonerna A, B och C, zonerna A och B, zonerna A och C, zonerna B och C eller zonen C. Medelvärde för adherensbildningarna var 2,1.

Fodergruppen: Sju fiskar hade adherenser av grad 1, tretton fiskar hade adherenser av grad 2 och 1 fisk hade adherenser av grad 3 (se diagram 6). Utbredningen var fördelad över zonerna A, B och C, zonerna A och C, zonerna B och C, zonen B eller zonen C. Medelvärde för adherensbildningarna var 1,7.

Aqui-S™grupp 1: En hane var könsmogen. En fisk hade adherenser av grad 1, femton fiskar hade adherenser av grad 2 och fem fiskar hade adherenser av grad 3 (se diagram 6). Utbredningen var fördelad över zonerna A, B och C, zonerna A och C eller zonerna B och C. Medelvärde för adherensbildningarna var 2,19.

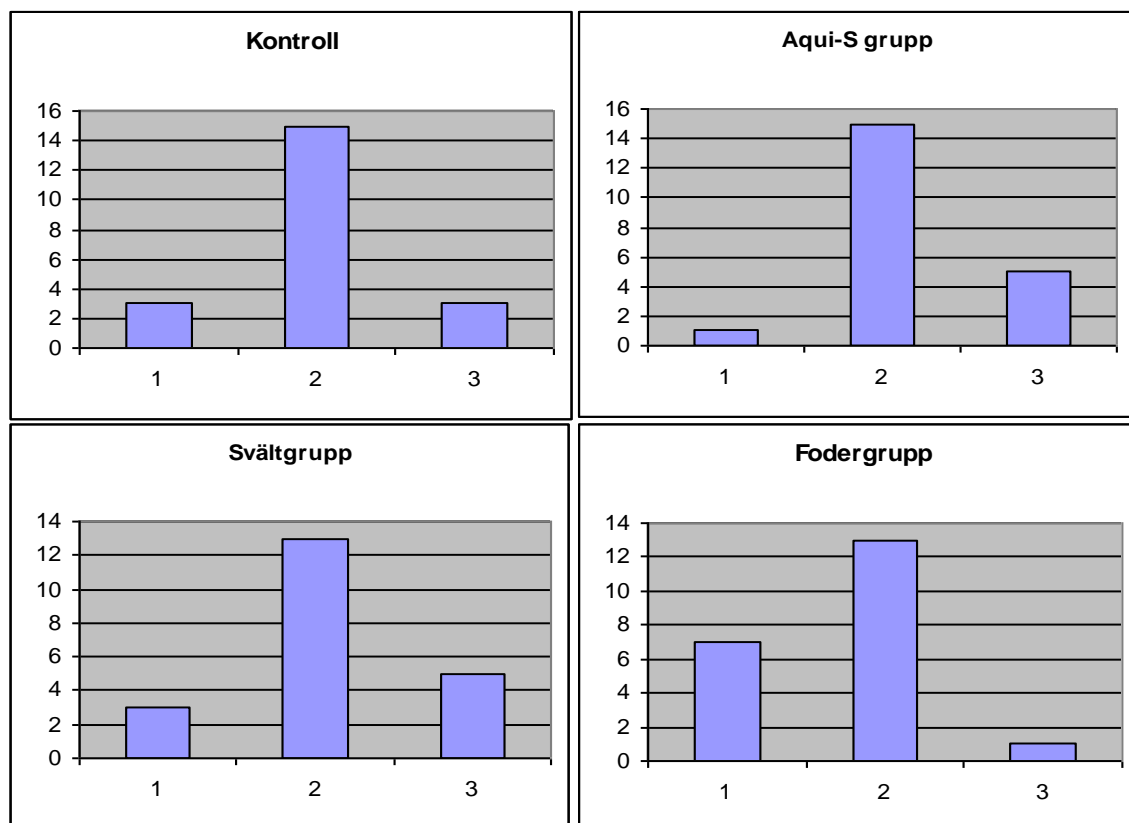


Diagram 6: Fördelning av adherensbildning inom grupperna. X-axeln anger grad av adherensbildning, Y-axeln antal fiskar med resp. grad av adherensbildning.

Jämförelse mellan grupperna

Foderintag

Dag -9 till -3: Under perioden kan ingen skillnad i foderintag i % av biomassa mellan grupperna ses, däremot var biomassan i svältgruppen mindre än för övriga grupper (Aqui-S™grupp1 $p < 0,001$, kontrollgruppen $p < 0,01$, fodergruppen $p < 0,05$). Vid invägningen dag -9 hade fisken i svältgruppen lägst medelvikt (18,83 g) och fisken i Aqui-S™grupp 1 hade högst medelvikt (19,18 g). Värdena för individens biomassa är teoretiska varje dag utom dag -9, vilket ger en mycket liten värdespridning som lätt resulterar i signifikans. Detta skulle kunna förklara svältgruppens stora avvikelser.

Dag -2 och -1: Foderintaget mättes enbart för en grupp, då övriga grupper svältes, och därför finns ingen statistik över dessa dagar.

Dag 0-3: Här skedde vaccinering och fisken slutade äta. Ingen statistik har gjorts för dessa dagar.

Dag 4-13: Aqui-S™grupp1 har under hela perioden ett signifikant lägre foderintag än svältgruppen och fodergruppen ($p < 0,01$ för båda grupperna). Biomassan skilde sig signifikant mellan alla grupper utom mellan kontrollgruppen och Aqui-S™grupp1 (för kontrollgrupp-svältgrupp samt kontrollgrupp-fodergrupp var $p < 0,01$, för Aqui-S™grupp1-svältgrupp $p < 0,001$ och Aqui-S™grupp1-fodergrupp $p < 0,05$, samt svältgrupp-fodergrupp $p < 0,001$). Fodergruppen hade högst medelvikt (22,03 g) och svältgruppen lägst (20,82 g). Under dag 4-8, då den snabbaste återhämtningen skedde för kontrollgruppen, svältgruppen och fodergruppen, men Aqui-S™grupp1 ännu inte riktigt börjat återhämta sig, skilde Aqui-S™grupp1 ut sig signifikant från övriga grupper vad gäller foderintag (kontrollgruppen $p < 0,01$, svältgruppen och fodergruppen $p < 0,001$). Kontrollgruppen och fodergruppen skilde sig också signifikant från varandra ($p < 0,05$). Biomassan för kontrollgruppen och svältgruppen skilde sig signifikant från alla övriga grupper ($p < 0,001$ i båda fallen). Biomassan för Aqui-S™grupp1 och fodergruppen skiljer sig inte signifikant under dessa dagar.

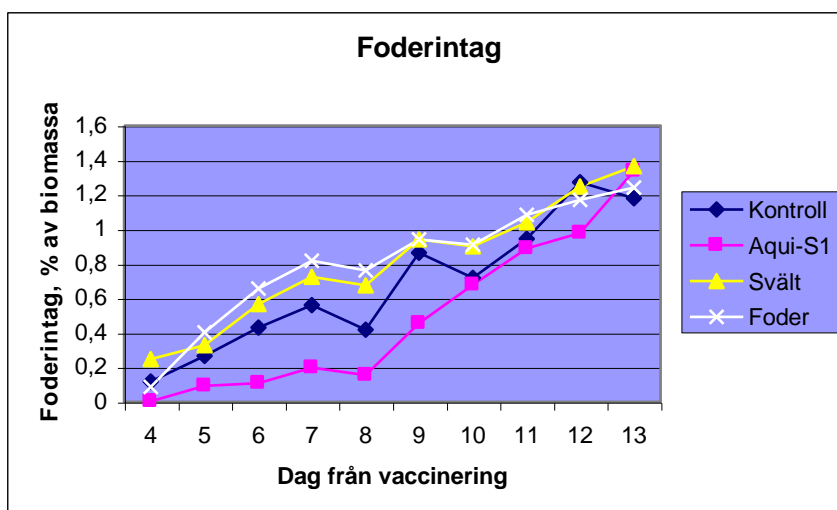


Diagram 7: Foderintag dag 4-13 efter vaccinering

Dag 14-26: Kontrollgruppens foderintag är signifikant högre än övriga gruppers ($p < 0,001$). Hos svältgruppen och fodergruppen sågs dessa dagar ett sämre foderintag i ett kar i respektive grupp, vilket drar ner medelintaget (s.k. kareffekt). Aqui-S™grupp1 hade genomgående ett något sämre foderintag under dessa dagar. Om de två sämre kareffekten) i svältgruppen och fodergruppen räknas bort, försvinner skillnaden i foderintag mot kontrollgruppen. Alla grupper skiljer istället ut signifikant mot Aqui-S™grupp1 (för kontrollgruppen $p < 0,001$, för svältgruppen $p < 0,01$, för fodergruppen $p < 0,05$). Inga signifikanta skillnader i kroppsvikt kan ses under perioden.

Vid invägning dag 26 var fiskens genomsnittliga slutvikt följande: kontrollgruppen 33,27 g, Aqui-S™grupp 1 31,91 g, svältgruppen 31,73 g och fodergruppen 31,25 g. Observera att viktökningen inte bara har att göra med hur mycket fisken äter, utan också hur väl den tillgodogör sig fodret = foderfaktorn (g foder/g tillväxt). Ju lägre foderfaktor, desto bättre utnyttjar fisken fodret. Foderfaktorn räknades ut från fiskens totala foderintag och totala viktökning. Högst foderfaktor hade fodergruppen (0,59 g foder/g tillväxt) och lägst Aqui-S™grupp 1 (0,50 g foder/g tillväxt). Detta är låga foderfaktorer, och fisken har utnyttjat fodret mycket bra.

Eftersom Aqui-S™grupp 2 sattes in senare kan den gruppen inte räknas med i försöket och direkt jämföras med övriga grupper. Därför finns ingen statistik över denna grupps foderintag.

Adherensbildning

Fodergruppen hade minst adherensbildningar, följt av kontrollgruppen, svältgruppen och Aqui-S™ grupp 1 som hade flest sådana. Mellan fodergruppen & Aqui-S™ grupp1 var det en signifikant skillnad i ärrbildning ($p=0,04$, SNK och $p=0,0125$, Duncan). Även mellan fodergruppen och svältgruppen var skillnaden signifikant ($p=0,04$, Duncan). Se fig. 8.

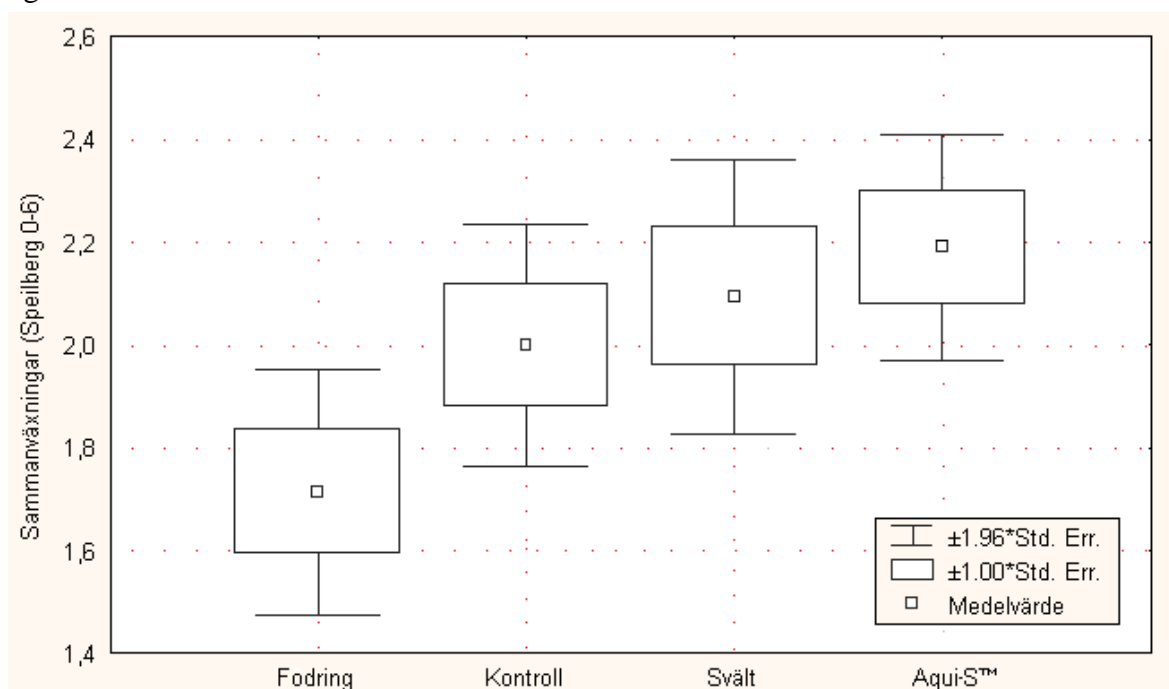


Fig.8: Boxplot över adherensbildningen inom grupperna.

Diskussion

De resultat jag fick i mitt försök var tvärtemot vad jag hade väntat mig när jag började mitt försök. Eftersom Aqui-S™ borde vara både smärtlindrande och inflammationshämmande hade jag förväntat mig en snabbare återhämtning för denna grupp än för övriga fiskar, men i stället tog gruppen längst tid på sig för återhämtning. Aqui-S™ har uppenbarligen en aptitstimulerande funktion på den dåliga fisken, troligtvis pga. att smärtan tas bort. Detta såg vi dels i Aqui-S™grupp 1 direkt efter vaccinering, dels i att

kar 11 (från kontrollgruppen) började äta direkt vid medicinering under den värsta perioden. När behandlingen avbröts för Aqui-S™grupp 1 verkade fiskarna dock må mycket sämre än övriga grupper och återhämningsperioden förlängdes. Aqui-S™grupp 1 verkar också ha haft en kraftigare inflammation om man tittar på ärrbildningen, som var signifikant kraftigare från fodergruppens. Den grupp som jag förväntat mig skulle må sämst, fodergruppen, återhämtade sig snabbast av alla grupper och hade minst ärrbildningar. Svältgruppen, som återhämtade sig i princip lika bra som fodergruppen var näst sämst vad gäller ärrbildning.

Ett senare försök vid Matre Havbruksstasjon indikerar att fisken inte slutar äta pga. stress i samband med hanteringen vid vaccinering, utan att det verkligen är inflammation/smärta som orsakar fallet i foderintag. Fisken i detta försök har antingen bara lyfts upp, fått en penna tryckt mot buken och släppts ner igen, eller injicerats med isoton NaCl-lösning. Fisken i dessa grupper ökade i foderintag mycket snabbare än kontrollgruppen som normalvaccinerades, och hade inte den karakteristiska minskningen i foderintag efter vaccinering (Johansson, 2000).

Fisken kan tränas till stresstålighet genom att utsättas för en låg dos daglig stress vilket jag kunde observera då jag varje dag kontrollerade fisken i karen. Efter bara ett par dagar var fisken betydligt lugnare då jag öppnade locken till karen.

Aqui-S™grupp 1 åt mycket mer än övriga grupper under framför allt dag 2, svältgruppen åt mest dag 3. Kan det vara så att vi lurar fisken att äta vid fel tidpunkt, under den akuta inflammationen, och att en full tarm resulterar i en kraftigare/förlängd inflammationsprocess än om fisken inte äter under denna period, dvs. dag 2-3?

Isoeugenol kanske hämmar COX-1 i stor utsträckning, vilket skulle ha negativa effekter för fiskens normala fysiologi. I så fall skulle ett minskat prostaglandinskydd i magsäcken ge minskad buffring och slemproduktion, samt en ökad saltsyraproduktion. Detta skulle kunna leda till perforerande ulcerationer och peritonit pga. läckage till bukhålan, och alltså en ökad inflammationsprocess. I så fall är Aqui-S™ inte ett bra alternativ för smärtlindring.

Hur stor roll spelar vattentemperaturen för inflammationens styrka och duration? Fisken återhämtade sig långsammare än i ett annat försök som utfördes under vintern (Oppedal et al, 2000). Man har också visat att adherensbildningen blir kraftigare vid högre temperaturer, vilket tyder på en kraftigare inflammation med mer fibrinutfällningar.

Det går inte att ur detta försök dra några tydliga slutsatser om Aqui-S™behandling i samband med vaccination. Istället för en förutbestämd tidpunkt för avbrott av behandlingen borde vi ha haft en biologisk indikator (kontrollgruppen) som tecken på när behandlingen kunde avbrytas, men som det blev nu avbröt vi behandlingen mitt i den värsta perioden. Ingen hade tidigare vaccinerat under sommaren, så det fanns inga återhämningsdata tillgängliga. Tidpunkten för när fisken börjar återhämta sig grundades istället på det försök som utförts under vintern. Man skulle också behöva analysera den kroniska adherensbilden bättre. Det andra Aqui-S™försöket (Aqui-S™grupp 2) som utfördes är inte heller direkt jämförbart med det första, eftersom försöken inte gick helt parallellt och fisken då hunnit bli större och vattnet troligtvis något varmare.

Isoeugenols farmakologiska effekter borde utredas. Har vi en mycket kraftigare COX-1-hämning än COX-2-hämning är preparatet direkt olämpligt att använda som antiinflammatoriskt/smärtstillande medel, eftersom vissa av kroppens normala fysiologiska mekanismer rubbas. Substansens eventuella neuromuskulära effekter - curare eller inte - bör testas, och eventuellt ska ett in vitro-försök för att pröva detta utföras under 2001. Om det är en curareliknande effekt som immobiliserar fisken får vi en skenbart lugn fisk, antagligen mycket stressad, men som inte kan röra sig. Att använda ett sådant preparat för att göra fisken hanterbar är mycket oetiskt.

MRL-värden bör fastställas om substansen ska fortsätta användas på livsmedelsproducerande djur, särskilt som substansen är fettlöslig, och därmed kan lagras i fisken under lång tid.

Försöket ger tydliga indikationer på att det är olämpligt att svälta fisken inför vaccinering, både ur ekonomisk synpunkt och ur djurskyddssynpunkt. Om man fodrar fisken fram till vaccinering vräker den inte i sig mat direkt efter ingreppet, och verkar inte drabbas lika hårt av inflammation och magont som standardvaccinerad fisk. Återhämtningen går snabbare och adherensbildningen blir mindre. Visserligen återhämtade sig fisken i svältgruppen i princip lika snabbt som fodergruppen, men adherensbildningen var kraftigare. Om förhållandet svält - ökad prostaglandinhalt i blodet, vilket visats på däggdjur (*Hans Kindahl, personlig kommunikation*), gäller även för fiskar, skulle detta kunna vara en rimlig förklaring till den ökade inflammationen/adherensbildningen hos kontrollgruppen och framför allt svältgruppen, jämfört med fodergruppen. När det sker en vasodilatation på inflammationsplatsen skulle då mer prostaglandiner kunna komma ut i vävnaden och ge ett ökat inflammationssvar och kraftigare fibrinutfällningar pga. kraftigare vävnadsskador.

Det skulle vara intressant att följa de olika grupperna till vuxen ålder för att utvärdera om immuniseringsprocessen påverkats något av de olika behandlingarna.

Sammanfattning

Det finns anledning att tro att vaccinering av fisk orsakar smärta. Målet med denna studie var att se om vi kunde minska fiskens lidande efter vaccination.

Fisken är ett kallblodigt djur och mer primitivt än varmblodiga djur, men bl.a. nervsystemet har samma basala byggnad som hos övriga vertebrater. Smärtfibersystemet är dock mer diffust än hos oss, och ingen specifik smärtledningsbana verkar vara nödvändig för smärtöverföring.

Alla djuretiska regler och lagar gäller även för fisk, men smärtlindring är ändå ett eftersatt område inom fiskerinäringen.

Smärta medieras av bl.a. prostaglandiner och bradykinin, ämnen som också är aktiva i den inflammatoriska processen. Vaccinering framkallar en inflammation, ofta med adherenser som följd. Fisken slutar äta dagarna efter vaccinering, vilket tyder på att inflammationen orsakar smärta. Många analgesipreparat hämmar prostaglandinsyntesen, och skyddar på så sätt mot både smärta och inflammation. De (lokal)anestesi- och analgesipreparat som används på fisk tillförs via vattnet och tas upp över gälarna. Därmed påverkas hela kroppen.

Fisken som användes är Atlantlax, *Salmo salar*. Initialt användes 1980 fiskar, fördelade på 14 kar, och senare ytterligare 400 st. fördelade på två kar. Fisken utfodrades 24 timmar om dygnet och hade också belysning dygnet runt.

Försöket delades upp i två delar. Under den första delen utvärderades olika metoder för mätning av foderintag. Under den andra delen, vaccinationsförsöket, undersöktes om olika utfodringsmodeller (svält/full utfodring) eller Aqui-S™ (isoeugenol, trolig smärtlindrare), kunde ha någon effekt på återhämtningen efter vaccination. Inför vaccinering svältes alla grupper utom fodergruppen under två dygn. Efter utförd vaccinering utfodrades fisken igen, utom svältgruppen som inte utfodrades förrän dag tre efter vaccinering. Denna första utfodringsdag fick fisken foder under 10 timmar.

För att registrera fiskens återhämtning användes foderintag i procent av biomassan, eftersom foderintaget är en mycket bra indikator på hur fisken mår.

Inför vaccineringen sederades fisken med benzocain. Vaccinet som användes var Norvax® Compact 6 vet. mot furunkulos, kallvattenvibrios, vibrios, vintersår och IPN. Injektionsdosen var 0,1 ml. Denna dos används oavsett fiskens storlek.

Den fisk som utfodrades genom hela försöket återhämtade sig snabbast, tätt följd av svältgruppen. Aqui-S™gruppen återhämtade sig långsammast och foderintaget var signifikant lägre än foder- och svältgruppernas foderintag. Kontrollgruppen hamnade mellan svältgruppen och Aqui-S™gruppen i återhämtning. Aqui-S™gruppen hade också mest adherenser, medan fodergruppen hade minst adherenser.

Försöket visar att det är olämpligt att svälta fisken inför vaccinering, men vad gäller Aqui-S™ behöver fler försök utföras och substansens farmakologiska effekter utredas innan några riktiga slutsatser kan dras.

Summary

Vaccination of fish can be assumed to cause pain. This study was designed to see if we can minimize the suffering of fish following vaccination.

Fishes are cold-blooded animals and thus more primitive than warm-blooded animals. Despite this, many organs, *e.g.* the nervous system, have the same basic structure as that of other vertebrates. The fibre system for conducting pain is more diffuse than in humans. No specific pain conducting tract seems necessary for pain transmission.

All ethical rules and laws for animals include fish, but pain killing is still not common in fish production.

Prostaglandins and bradykinin are substances which are released in the inflammatory process and cause pain. Vaccination causes peritonitis and adherence between organs and the abdominal wall (scarring). The peritonitis can be assumed to cause pain, which may be one reason why the fish stops feeding for several days following vaccination. Many analgesics inhibit the synthesis of prostaglandin, and thus inhibit both pain and inflammation. The local anesthetics used to immobilize fish are given in the water and taken up via the gills. This gives systemic effects.

Atlantic salmon, *Salmo salar*, was used. 1980 parr were allocated in 14 tubs. Later another 400 parr in two tubs were used. The fish had free access to feed and had continuous daylight.

The study was split into two parts. In the first part, two methods for measurement of feed intake was evaluated. In the second part different feeding models (starvation/feeding) and Aqui-S™ (isoeugenol, which probably diminishes the pain), was used to see if we could affect the time for recovery following vaccination. Before vaccination all groups besides the feed group were starved for two days. Following vaccination, the fish was fed again, except for the starvation group, that was not fed until day three after vaccination. The first feeding day the fish was fed for 10 hours.

The pain level was measured as feed intake in percent of biomass, since feed intake is a very good indicator of the well-being of the fish.

Before vaccination the fish was sedated with benzocain, the routine sedative at vaccination. The vaccine used was Norvax® Compact 6 vet. for furunculosis, cold water vibriosis, vibriosis, winter wounds and IPN. The injection dose was 0,1 ml. This dose is used independent of the size of the fish.

The group of fish that was fed all the way through the study recovered fastest; followed by the group that was starved for three days following vaccination. The Aqui-S™group recovered much slower, and the feed intake was significantly lower than for the feed- and starving groups. The control group recovered more slowly than the starvation group

but faster than the Aqui-S™ group. The Aqui-S™ group had most adherences, and the feed group had the least.

The study clearly shows that starvation prior to vaccination of the fish is wrong. The pharmacological effects of Aqui-S™ need to be evaluated and more experiments need to be done before we can come to any conclusions about its effectiveness as an analgesic.

Tack

Tack till alla på Matre Havbruksstasjon, ni fick stå ut med mycket frågvishet och diskussionslust från min sida. Ett särskilt tack till Arne Berg som hjälpte till med dissektion och bedömning av adherenser, samt gav mig fakta om detta område. Tack till Ida Lillejord som sorterade och vägde in fisken åt mig, och som är en god vän.

Tack till Hans Kindahl, OG, Klinikcentrum, Ultuna, och Kristina Odensvik-Kindahl, apoteket på KC, Ultuna, för en givande diskussion angående prostaglandiner, deras verkningsmekanismer och hämning av syntesen av dessa.

Tack till mina handledare:

- Anders Kiessling, som höjde mitt fiskintresse till ”högre nivåer”, gav mig projektet och som ständigt har nya idéer att stimulera mitt forskningsintresse med.
- Kerstin Olsson, tack för all hjälp med att skapa ett bra skriftligt arbete, för visat intresse för fisk och etik samt mycket givande diskussioner.

Referenslista

Böcker

Brown, L. (editor), Aquaculture for veterinarians, 1993: 1, 4-6, 21-22, 161-167. Pergamon Press

Goth A., Medical pharmacology, 10th ed., 1981, The C.V. Mosby Company

Hansen, T. (redaktör), Oppdrett av laksesmolt, 1998: 27-48. Landbruksförlaget

Iwama G.K., Pickering A.D., Sumpter J.P., Schreck C.B. (Editors), Fish Stress and Health in Aquaculture, 1st ed., 1997. Society for Experimental Biology

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. Pharmacology, 4th ed., 1999: 215-217, 221-222, 229-233. Harcourt Publishers Limited

Ross L.G., Ross B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals 2nd ed., 1999. Blackwell Science Ltd

Artiklar

Brodin P., Roed A., 1984. Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparation. Arch Oral Biol 1984;29 (8): 611-615

Helland S.J., Grisdale-Helland B., Nerland S., 1995. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. Aquaculture 139 (1996): 157-163

Keene J.L., Noakes D.L.G., Moccia R.D., Soto C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture research, vol 29: 89-101

Midtlyng, P.J., Reitan, L.J. and Speilberg, L., 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Fish & Shellfish Immunol. 6: 335-350.

Olsen Y.A., Einarsdottir I.E., Nilssen K.J., 1994. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasmacortisol increase during stress. *Aquaculture* 134 (1995): 155-168

Oppedal F., Johansson B.M., Kiessling A., 2000. Bedøvelse og vaksinerings – økt appetitt ved bedre rutiner. *Norsk Fiskeoppdrett* 9/2000: 24-26

Rajakumar D.V., Rao M.N.A., 1993. Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. *Biochemical pharmacology*, Vol. 46, No 11 1993: 2067-2072

Thompson, D., Eling, T., 1989. Mechanism of Inhibition of Prostaglandine H Synthase by Eugenol and Other Phenolic Peroxidase Substrates. *Molecular Pharmacology* 36 (1989): 809-817

Examensarbete

Johansson, D., Vad orsakar aptitförlusten hos Lax (*Salmo salar* L.) i samband med vaccinering? MSc-thesis, 2001, Swedish university of Agricultural Science, Department of Aquaculture

Internetreferenser

<http://www.biam2.org/www/Sub1637.html> (eugenols verkningsmekanismer)

<http://www.hort.purdue.edu/rhocv/hort640c/secprod/se00017.htm> (eugenol/isoegenol-syntes)

<http://www.Aqui-S.com>

Övrig litteratur/artiklar som använts för förkovring, men som ej använts som referenser

Hoar W.S., Randall D.J. (Editors). *Fish Physiology*, vol 2, 1969. Academic Press

Anonym författare: Do fish feel pain? *Surveillance* 26(3), 1999

Stoskopf M.K. *Fish Medicine*, 1993: 79-90. Saunders förlag

Chervova L.S., 1996. Pain Sensitivity and Behaviour in Fishes. *Journal of Ichthyology*, vol. 37, no. 1, 1997: 98-102

Stehly G.R., Gingerich W.H., 1999. Evaluation of Aqui-S™ (efficacy ad minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquaculture research*, vol. 30, no 5: 365-372

Uchida M., Nakajin S., Toyoshima S., Shinoda M., Antioxidative Effect of Sesamol and Related Compounds on Lipid Peroxidation. *Biol. Pharm. Bull* 19(4) (1996): 623-626