



# NTNU

Kunnskap for en bedre verden

# Bacheloroppgave

MB301612

Kortisolnivå i feces hos laks som velferdsindikator i lakseoppdrett.

Kandidatnummer:1304

Totalt antall sider inkludert forsiden: 52

Innlevert Ålesund, 02.06.2016

## Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none"><li>• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.</li><li>• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.</li><li>• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.</li><li>• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.</li></ul>	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. <a href="#">Universitets- og høgskoleloven</a> §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

# Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22,5

Veileder: Ann Kristin Tveten

## Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjenning.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja  nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja  nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja  nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja  nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13/Fvl. §13](#))

Dato: 01.06.2016

## Sammendrag

I denne oppgaven undersøkes muligheten om å bruke kortisol som velferdsindikator i lakseoppdrett, samt om det er mulig å bruke ekstrahering av kortisol fra tørr laksefeces. Det ble undersøkt effektivitet av kortisol ekstraksjonsmetode fra tørr feces ved bruk av gjenfinningsmetoden. Metodevalidering viste at kortisolekstraksjon fra tørr feces er lite egnet for bruk på grunn av metodens lav effektivitet.

For å bruke kortisol som indikator er det nødvendig å ha et referanseområde.

Til etablering av referanseområde ble det samlet og analysert 200 fecesprøver ved hjelp av ELISA-metoden. Det ble beregnet referansegrensene for kortisolnivå i feces hos laks.

Kortisolnivå-måling i feces hos laks gir mulighet til å kontrollere fiskehelse og velferd i lakseoppdrett ved å sammenligne den målte verdien med referanseområdet.

## **Forord.**

Denne bacheloroppgaven undersøker muligheten ved å kunne bruke kortisol som velferdsindikator i lakseoppdrett.

Fiskehelse og velferd har stor betydning for lakseoppdrett og er aktuelt tema i dag, derfor var det veldig spennende å jobbe med denne oppgaven.

Jeg vil takke Ann Kristin Tveten for god hjelp og støtte under arbeidet.

# Innholdsfortegnelse

Forord	
Ordliste.....	3
Innledning.....	4
- Problemstilling.....	4
1. Teori.....	5
1.1 Laks i lakseoppdrett.....	5
1.2 Velferd hos laks.....	6
1.3 Velferdsindikatorer.....	7
1.4 Stress hos laks.....	7
1.5 Kortisol.....	10
1.6 Kortisol som indikator på stress og velferd.....	13
1.7 Validering av en analysemetode.....	14
1.7.1 Etablering av referanseområder.....	14
1.7.2. Analysevariasjon.....	15
1.7.3 Kalibreringskurv.....	16
1.7.4 Deteksjons-grense.....	16
1.7.5 Gjenfinning.....	17
1.8 Kortisol utvinning.....	18
1.9 Kvantitativ analyse av kortisol-ELISA.....	19
2. Materialer og metoder.....	21
2.1 Prøve innsamling.....	21
2.2 Materialer for kortisol ekstraksjon.....	21
2.3 Materialer for kortisolanalyse.....	21
2.4 Prosedyre.....	21
2.4.1 Prosedyre for gjenfinning og ekstraksjonsmetode.....	21
2.4.2 Prosedyre for kortisolanalyse .....	21
3. Resultat.....	22
4. Diskusjon.....	37
5. Konklusjon.....	40
6. Referanser.....	41
Vedlegg:	

1. Prosedyre for gjenfinning og ekstraksjonsmetode
2. Prosedyre for kortisolanalyse med ELISA.
3. Cortisol ELISA-kit instructions.

## **Ordliste.**

ACTH- AdrenoCorticoTropic Hormone

HPI-aksen- Hypothalami-Pituitary(hypofyse)-Interrenal axis

CRH - Corticotropin Releasing(frigjøring) Hormon

ELISA -Enzyme-linked immunosorbent assay



## **Innledning.**

Lakseoppdrett er en av Norges største og viktigste næringer, og Norge er den største produsenten av atlantisk laks. Laks egner seg godt i fiskeoppdrett da den trives lett, har god utnyttelse av foret og er en fet fisk som inneholder mye av de helsefremmende omega-3-fettsyrene. Laksen er vårt mest effektive husdyr, og i gjennomsnitt brukes det 1,5 kilogram marint råstoff til å produsere 1 kilogram laks (1).

Det er noen utfordringer med fiskehelse og velferd i oppdrett av laks.

Mange av disse utfordringene kan løses gjennom et godt samspill mellom næringsaktørene, forvaltningen og forskere (1). Akvakulturdriftsforskriften regulerer drift av akvakulturnæringen for å fremme lønnsomhet, konkurransekraft, for å fremme god helse og god velferd hos fisk (2).

Sikring av fiskehelsen har stor betydning for sjømatproduksjonen, og er viktig for å ivareta fiskevelferden. Havbruksaktørene har derfor et kontinuerlig fokus for å ha best mulig fiskehelse i anleggene (1). Lakselus er det største problemet i lakseoppdrett i dag, da den svekker fiskehelsen. For å bekjempe parasitten kreves det medikamentell behandling av fisken - avlusing. Samtidig utgjør medikamentell avlusing også en risiko for fiskens helse og velferd. For å kontrollere risiko

### **Problemstilling for bacheloroppgaven:**

Kan kortisolnivå i feces til laks brukes som en velferdsindikator i lakseoppdrett?

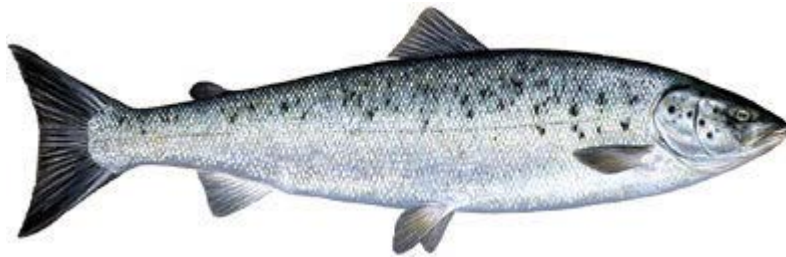
- Kan en etablere et referanseområde for kortisolnivå i feces hos ustresset laks, basert på månedlige innsamlinger gjennom et år?
- Hvilken metode for kortisolutvinning er best egnet for fecesprøver?

# 1. Teori

## 1.1 Laks i lakseoppdrett.

Laks er mest verdifulle fisken i Norge,(Figur 1). Hannlaks kan bli 150 cm lang og 40 kg tung, hunnlaks kan bli 120 cm og 20 kg (3). Laksen starter livet sitt i ferskvann.

Villakshunnen graver eggene dypt ned i grovgrusen i oktober og november. På ettervinteren klekker eggene, og yngelen blir værende i grusen til plommesekken er tømt for næring (3). Etter klekking lever lakseungene i rennende ferskvann. Kroppen deres blir dekket av flekker. Dette stadiet kalles parr-stadiet. Etter noen år (2-5 år) vil kroppen til parren forandres, den blir mer langstrakt og sølvglinsende (3). Dette stadiet kalles smolt (3,4,5). Om våren får smolten blank farge og vandrer til havs. Laks er en anadrom fisk, som har toleranse for både saltvann, brakkvann og ferskvann (4).



Figur 1: Atlantisk laks- *Salmo salar* (3).

I oppdrett bruker en fra 8 til 18 måneder i ferskvann for å få fram en smolt på rundt 100 gram, og som er klar til å gå i sjøvann. Smolten settes i store merder i sjøen, hvor den vokser fra 100 gram til slaktevekt på 3-6 kilogram i løpet av 12-18 måneder (3,4). Det er ønskelig å få laksen opp i slakteklar størrelse før den blir kjønnsmoden, da kjønnsmoden laks slutter å vokse, kjøttkvaliteten blir dårlig (4,5). Nesten alt av lakseproduksjon skjer i store merder i sjøen. Plasseringen av disse bestemmer i stor grad et oppdretts-miljø (3). Miljøet i et oppdrett har stor betydning for fiskens helse og trivsel. Det er mange ting som spiller inn her; vannstrøm, oksygeninnhold, temperatur, bølger, saltholdighet, dybden, størrelse og avstanden mellom merder, fisketettheten (4,5).

Oppdrett har ansvar for fiskens velferd. Men dette er ikke lett, overvåking av individene er en utfordring med det store antallet individer, vanskeligheter med å måle miljøet (4). I tillegg har oppdretterne begrenset kunnskap om miljøkrav, tålegrenser til laks for ulike

miljøfaktorer og oppdrettsprosedyrer (3,4). Derfor er det viktig å utvikle teknologi og metoder for å kunne overvåke velferd hos laks i oppdrett (4). Det er nødvendig å ha en velferdsindikator.

## **1.2 Velferd hos laks.**

Dyr har egenverdi uavhengig av den nytteverdien de måtte ha for mennesker (6). Slik hevder lov om dyre-velferd, som trådte i kraft i juni 2009 i Norge. I den nye loven blir fisk behandlet på lik linje med andre dyr. En rekke driftsforskrifter stiller strengere krav til fiskens velferd. God fiskevelferd er en viktig forutsetning for god fiskehelse, lav dødelighet, god kvalitet, godt omdømme og god lønnsomhet (7).

Dyrevelferd har fått større fokus og det er økende press fra forbrukere og myndigheter for å dokumentere god velferd (4). Hva mener vi med god dyrevelferd? De fleste mener at god dyrevelferd innebærer fravær av 1-sult og tørste 2- miljøutfordringer, 3-skade og sykdom, 4- atferd begrensninger/plassmangel, 5- mental lidelse (8).

Den optimale temperaturen i vann for god vekst av laks er 13-18 grader C. Lavere temperaturer reduserer fiskens appetitt. Voksen laks er lite påvirket av saltholdighet, fordi atlantisk laks er en anadrom fisk. Men endringer i saltholdighet kan sammen med andre uheldige faktorer medføre stress (9). Lav oksygentilgjengelighet i fiskens omgivelser kan føre til stress, utmattelse, dårlig velferd og vil i verste fall føre til kollaps og død.

Vannstrøm har betydning for velferd. Høy vannstrøm krever høy strømmotstand, noe som kan føre til stress og utmattelse. Mye fisk på et lite vannvolum (tetthet) fører til redusert vannkvalitet (mindre oksygen og stress) og påvirker fiskens velferd. Det er 22 kilogram per m<sup>3</sup>, som er den kritiske tettheten for laks (9). Lys er en bestemmende faktor for laksens vertikale plassering i merd. Fisk unnviker høy lys-intensitet (9). Fisken går dypt i sjøen på dagtid og høyt om natten (5,9).

Fiskens skinn er en barriere mellom kroppen og omgivelsene. Skinn spiller en viktig rolle i fiskens osmoseregulering, derfor kan skinnskader fra lakselus eller infeksjonssykdommer føre til stress og redusert velferd hos fisken (9). Laks i oppdrett har begrenset mulighet til flukt, noe som gjør den mer sårbar.

Sykdom, lus og avlusing, håndtering, redusert vannkvalitet, høy tetthet, eksponering for predatorer er trusler som kan føre til stress og redusere fiskens velferd i oppdrett.

### **1.3 Velferdsindikatorer.**

Lakseoppdrett trenger objektive og målbare kriterier for fiskens velferd, såkalte velferdsindikatorer. På oppdrettsanleggene brukes i dag parametere som helsetilstand, overlevelse, tilvekst, appetitt og atferd.

*Ideelt bør en velferdsindikator ha følgende egenskaper:*

1. *Være målbar og enkel å måle.*
2. *Være sensitiv for alle forhold som påvirker fiskens velferd.*
3. *Være spesifikk og ikke følsom for forhold som ikke påvirker fiskens velferd.*
4. *Tillate objektiv måling i alle individer i hele gruppen.*
5. *Være brukbar og sammenlignbar uavhengig av art og livs-stadium (10).*

Dødelighet i en populasjon kan benyttes som en velferdsindikator. Om dødeligheten blir unaturlig høy, kan dette være en indikasjon på at velferden ikke er tilfredsstillende. Men dødelighet er et grovt mål på velferd (11). Appetitt kan indikere fiskens velferd. Tap av appetitt kan relateres til ett eller flere forhold som stresser fisken, og som reduserer fiskens velferd. Men tap av appetitt på et mindre antall av fisk i populasjonen blir ikke registrert og undersøkt (9).

Kondisjons-faktor og avmagring kan bli velferdsindikator. Analyse av fiskens forhold mellom lengde og vekt er en metode for å indikere fiskens tilstand, hvor tyngre fisk med gitt lengde antas å ha bedre velferd (9). Alle disse indikatorene er ikke gode nok.

Fravær av spenning er en potensiell indikator på dyrevelferd (9). På hver endring i miljøet reagerer fisken med stress. Derfor kan vurderingen av stressnivå hjelpe til å overvåke velferd i oppdrett. Kortisol vil være et mål og en indikator på trivsel eller velferd.

### **1.4 Stress hos laks.**

Stress er en tilstand hvor fiskens likevekt (homeostase) påvirkes av en intern eller ekstern faktor (stressor) (12,13). I naturen har fisken mulighet for å søke til det miljøet som gir de beste livsforholdene for å unngå stress (14). Kultivert fisk har ikke denne muligheten, og er "bundet" til kultiveringensheten (14). I oppdretten kan derfor fisk ofte oppleve veldig utfordrende situasjoner.

Faktorer som utløser stress hos fisk kan være for eksempel: Dårlig vannkjemi, håndtering, transport, vaksinerings, predatorer, sykdom, lus og mye annet.

Lakselus (*Lepeophtheirus Salmonis*) er en krepsdyrparasitt og klassifiseres som hoppekreps, som har eksistert sammen med laksefisk lenge. Lakselusen er første gang omtalt på 1600-tallet (15).

Lus skader fisken ved at de fester og ernærer seg på fiskens vev og slim og blod. Bare en lav infeksjon har vist å påvirke fisken ved å redusere svømmekapasitet til 19-22 %, dårligere vekst (9,16). Svært høy infeksjon fører til sår-utvikling, forstyrrelser i saltbalansen, sekundære infeksjoner, sykdommer og død (9).

Lus, hyppig avlusning og behandling utgjør et potensielt velferdsproblem i lakseoppdrett (9).

Lakselusforskriften stiller krav at det skal være færre enn 0,5 voksen hunnlus i gjennomsnitt per fisk i anlegget (17). Fra 5. mars til 10. april er det krav til behandling om det påvises 0,1 lakselus eller flere bevegelige stadier og voksen hunnlus i gjennomsnitt per fisk (17). For å opprettholde kravene må oppdretts aktører behandle fisk med avlusingsmiddel ganske ofte. Bruken av lusemiddel har økt de siste årene (18). Forskere har påvist en direkte sammenheng mellom stress og dødelighet i lakseoppdrett. De konstaterer at økt stressbelastning skjer over korte perioder- under behandlingen av fisken (19). Stress fører til fysiologiske endringer i fiskens kropp, (Tabell 1)

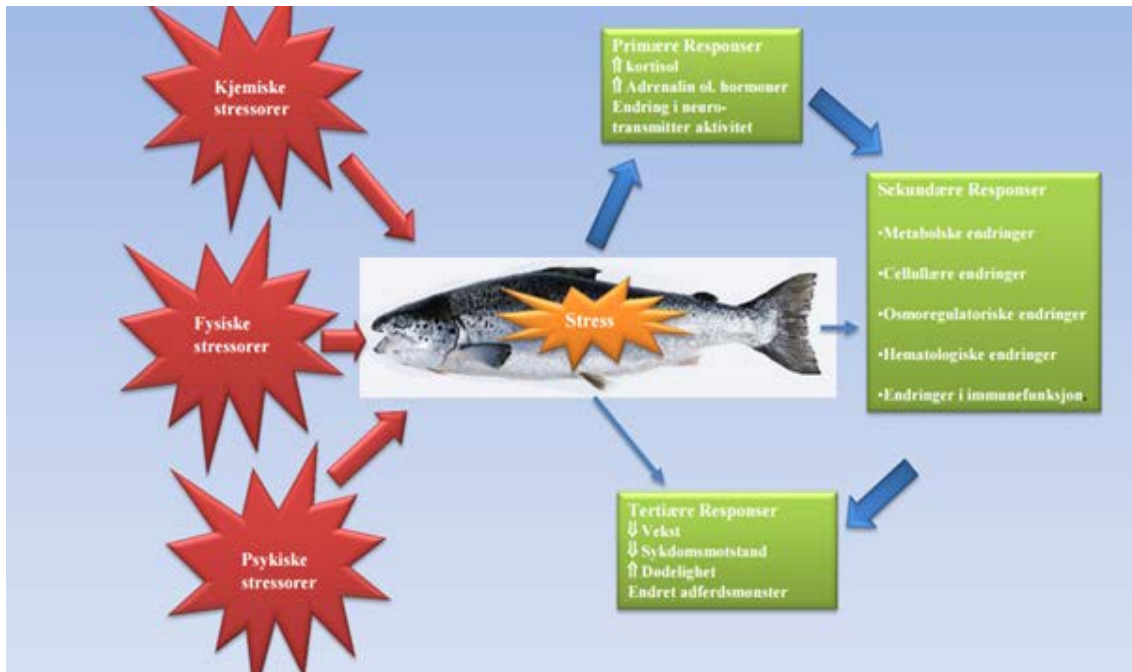
Tabell1: Fysiologiske forandringer hos fisk ved stress (20):

Parameter	Ved stress
CRF, ACTH, kortisol	↑
Katekolaminer	↑
Serotonerg/dopaminerg aktivitet	↑
Prolaktin, somatolaktin	↑
Stressproteiner	↑
Blodtrykk og hjerterate	↑
Glukose i blod	↑
Laktat	↑
pH i blod	↓
Hematokrit	↑
Plasmaklorid	↓
Immunfunksjon	↓

Stressrespons er en funksjon som hjelper fisken til å takle forstyrrelse i kroppens fysiologiske likevekt-homeostase (9).

Vi kan dele opp fiskens stressrespons i primær, sekundær, tertiær respons,(Figur2). Primærrespons er aktivering av HPI-aksen (Hypothalamus/hypofyse/interrenal-aksen), økning av adrenalin, noradrenalin, kortisol i blod (8,21,25,26). Og som følge er sekundær respons: endringer i metabolismen (økning av glukose i blod, nedgang av glukogen ute i vevet), endringer i immunfunksjonen (8,21,22,25,).

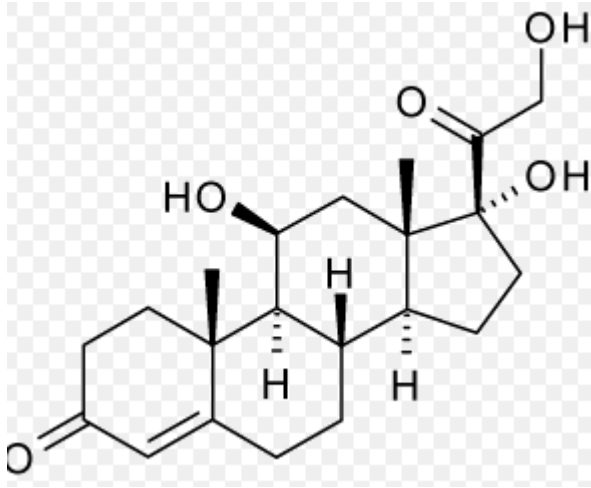
Kortisol øker hjerterefrekvens, oksygenopptak, mobiliserer energi til å flykte, forstyrrer hydro-og mineralbalansen (8,9,21,25,26). Den sekundære responsen fører til tertiærrespons; redusert vekst og reproduksjon, svekket immunforsvar, endret atferd (aggresjon) og svømme-evne (9,21). Stressrespons er en naturlig tilstand hos fisk og er en nødvendig og svært viktig funksjon for fiskens overlevelse (8,9). Korttidsstress (akutt stress- i minutter til timer) er derfor positivt og betyr ikke nødvendigvis reduisering av velferd (9). Men stress som varer i flere timer, uker eller måneder (kronisk stress) fører til langvarig tertiærrespons og er en trussel for fiskens velferd (9). Det er viktig å skille mellom effekter forårsaket av kortvarig stress på den ene siden, og mer langvarig, kronisk stress på den annen (21), understreker professor i immunologi/bioteknologi ved Universitetet i Oslo, Tor Lea. Han peker på at kortvarig stressbelastning utløser hormonnivåer som ser ut til å ha en stimulerende effekt på adaptiv immunitet. Langvarig eller kronisk stresspåvirkning derimot, virker immunsuppressivt (21). Ved kronisk stress er kortisol-nivået mye lavere enn ved akutt stress. Den konstante interrenale aktiviteten ved kronisk stress nedregulerer HPI-aksen (som resultat av negative tilbakemeldinger av kortisol) (13). Dette fører til svekkelse av responsen til flere stressfaktorer. Slike faktorer som for eksempel- dårlig vannkvalitet eller giftstoffene kan forårsake kronisk stress (13). Disse faktorene kan forverre, svekke kortisol respons på en andre akutt stressfaktor (13). I et forsøk ble fisken med kronisk stress (på grunn av vannforurensninger) utsatt for akutt stress. Fiskens kortisolnivå ble redusert betraktelig i forhold til kontroller (13).



Figur 2: Konseptet stress og dets mulige effekter på fisk (22).

### 1.5 Kortisol.

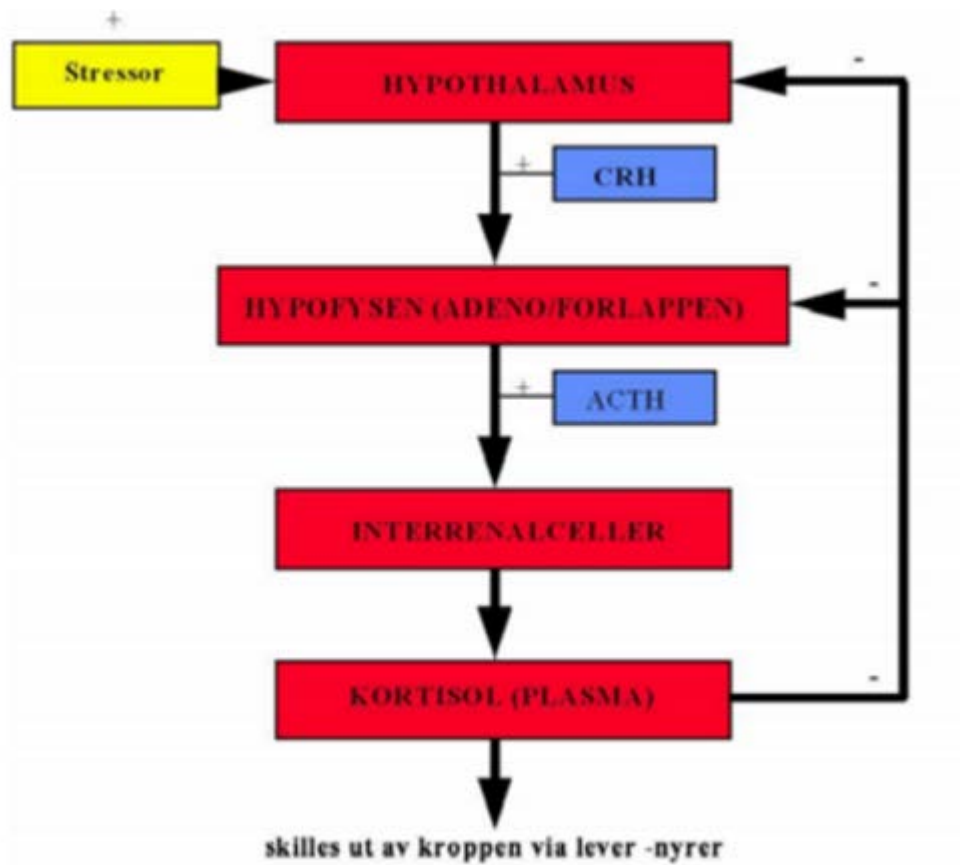
Kortisol er et stresshormon (Figur 3). Det produseres i binyrebarken (cortex, hvorav navnet). Kortisol påvirker reguleringen av metabolisme, immunsystem, hjerte, vekst (8). Kortisol-syntesen er nøye regulert av sentralnervesystemet (24,25,26). Utskillelsen av kortisol fra binyrene stimuleres av hypofysehormonet ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone), og er kraftigst i tidlige morgentimer (8,24,26)



Figur 3: Kortisol, kjemisk struktur (23).

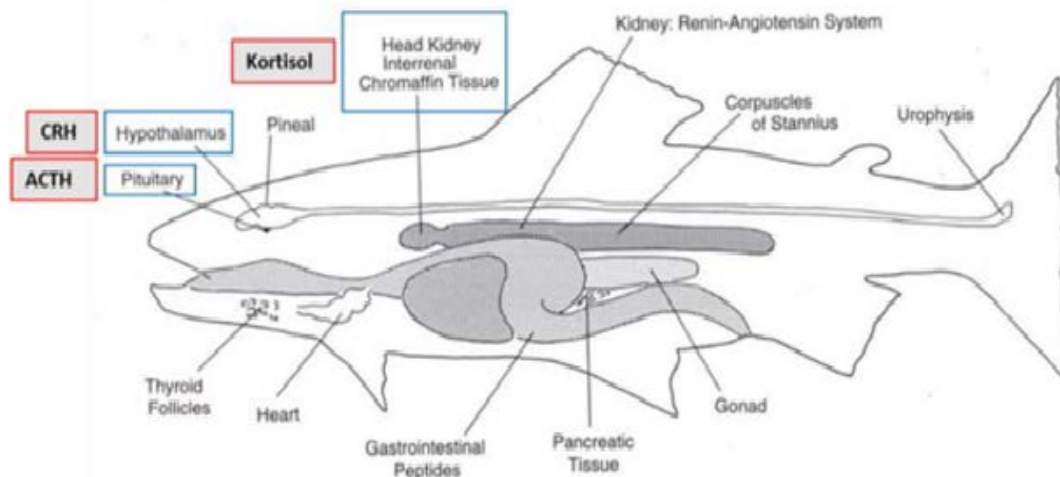
HPI-aksen er en endokrin akse som mobiliseres når fisken utsettes for stress, (Figur 4). Som respons på stress produserer hypothalamus CRH (Corticotropin Releasing(frigjørende) Hormon), som går til hypofysen og stimulerer utskillelsen av ACTH. ACTH transporteres til hodenyren og i sin tur stimulerer det interrenalt vev (nyre vev) til produksjon av kortisol (8,9). HPI-aksen reguleres gjennom negative tilbakekoblingmekanismer (8,9). Kortisol påvirker sin egen utskillelse ved negativ tilbakekobling direkte med hypofysen og hypothalamusen (8,9,24,26).





Figur 4: HPI-aksen hos fisk(8). Aktiviteten til HPI-aksen er regulert gjennom negative tilbakekoblingmekanismer.

Hos fisk er cellene som syntetiserer kortisol (interrenale celler) ikke en kjertel, de ligger spredt på overflaten, tett inntil blodkar i fremre del av nyrene (hodenyren) (8),(Figur 5). Produsert kortisol fraktes via diffusjon til blodbanen. Kortisol er et fettløselig hormon, og derfor avhengig av å være bundet til transportproteiner for å kunne fraktes til målceller via blod (9,26). Kortisol finnes i bundet form til transportprotein (biologisk inaktiv) eller i ubundet form fritt i plasma (biologisk aktivt), og i metabolisert (inaktiv form) inne i en målcelle (26). Metabolske endringer gjør at kortisol blir redusert og inaktivert og mer vannløselig (9). Kortisol metabolitter skilles ut av kroppen gjennom lever og nyrer til urin og feces (8).



Figur 5: HPI-aksen hos fisk. Organene som er ansvarlige for produksjon av stresshormonene i HPI-aksen er indikert med blå firkanter, hormonene er indikert med røde firkanter (8).

### 1.6 Kortisol som indikator på stress og velferd.

Det er veldig viktig for oppdretterne å ha en indikator som viser fiskens tilstand. Fisk kan selv håndtere stress over en kort periode, det vil si at fisk har en adaptiv stressrespons (8). Men etter en viss tid vil energireservene være tappet, noe som kan føre til negative konsekvenser for fisk (8). Forhøyet konsentrasjon av kortisol over lengre perioder av gangen fører til kronisk stress eller mal-adaptiv stress, noe som svekker fiskens helse og overlevelse (9,11). En kortisol-nivå måling hjelper å kontrollere fiskens tilstand, hjelper å ha kontroll over grensen der adaptiv stressrespons går over til mal-adaptiv (8).

Måling av kortisol-nivået i blod er ikke aktuelt på grunn av selve prøvetakingen, som fører til en sterk stressreaksjon hos fisken og som igjen vil virke inn på blodanalysene (11). Men kortisol-nivå i avføringen skulle vise et samlet bilde av fiskens generelle stressnivå noen tid tilbake prøvetakingen på grunn av gut-passasje og akkumulering av hormon metabolitter i mage-tarmkanalen (12).

Kortisol-nivå måling kan bli en god velferdsindikator. Den er målbar og enkel å måle. Det er umulig å finne mer sensitive indikatoren for fiske-velferd, fordi fisk reagerer med stress på alle forhold som påvirker velferd. Samtidig er kortisol-nivå måling spesifikk og ikke følsom for forhold som ikke påvirker fiskens velferd. Denne indikatoren kan objektivt måle stressnivå hos alle fisker i anlegget. Kortisol som velferdsindikator kan brukes hos

alle dyr og fisk. Men mengder av kortisol er avhengig av dyrets livs-stadium, og er forskjellig ikke bare mellom dyr og fisk, men mellom nært beslektede arter også. Barton og Ruane viste begge i forsøkene sine at respons på samme stress (dvs økning av kortisol-nivå) hos ørret (*Salmo trutta*) var større enn hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (13). Derfor er det veldig viktig å ha mer kunnskap om en bestemt art og dens fysiologi. For å bruke kortisol som velferdsindikator er det nødvendig å finne referanseområder for kortisol-nivå til en bestemt art i et bestemt livs-stadium.

### **1.7 Validering av en analysemetode.**

Validering av en analysemetode er nødvendig før den tas i bruk. Validering av en analysemetode er en verifisering og dokumentering at en metode er egnet til sitt formål. Den finner ut hvor pålitelig metoden er og om resultatene en får ligger nær prøvens sanne verdi (27).

Valideringen går ut på å fastsette og beskrive analysemetodens parametere. Noen av de parametere er prøvemateriale, referanseområder, kalibrerings-kurve, deteksjons-grense, nøyaktighet, presisjon, analytisk range, analysevariasjon, gjenfinning.

Valideringen av en analysemetode er en kvalitetssikring av analyseresultat (27).

#### **1.7.1. Etablering av referanseområder.**

Referanseområde for et prøveresultat er det tallintervallet der man forventer å finne 95% av prøveverdiene, når prøvene er tatt fra en stor gruppe individer (28). Dette tallintervallet er nødvendig for å sammenligne prøveresultatet mot referanseområdet, som er blitt gjort tidligere på samme analyse. En kan se, at hvis et analyseresultat ligger innenfor referanseområdet, er verdiene normale. Uten referansedata kan ikke prøveresultatet tolkes (28). Men man må huske, at 2,5 % av alle friske individer har normale verdier under referanseverdiene og 2,5 % har verdier over.

Referanseområder varierer ikke bare med kjønn og alder, men også med testmetode og laboratorier analysen ble utført. Derfor er det viktig, at hver oppdrett har sine egne referanseområder for fisk i bestemt alder og kjønn, som ble etablert ved bruk av det samme testmetode som selve kortisolnivå-analysene.

Etableringsprosess for et referanseområde:

1. Valg av referanseindivider. Det må bli en stor gruppe på 120-180 stykker.

2. Innsamling av prøver. Forholdsregler ved prøvetaking og prøvebehandling av referanseprøver må bli de samme som ved analyse etter avlusing (28).
3. Analytisk prosedyre. Referanseprøver og prøver må analyseres med samme metode og samme kontrollprosedyrer.
4. Statistisk prosedyre. Statistisk prosedyre innebærer:
  - Histogram-tegning, som gir en oversikt over fordelingen.
  - Vurdering av histogrammet: om det er normal fordeling (er det avvikende verdier, homogen fordeling) (28)..
  - Bestemmelse av referanseområde: hvis verdiene er normalt fordelt, bestemmes referanseområde ved hjelp av interpercentil-intervall. Hvis verdiene ikke er normal fordelt brukes da ikke-parametrisk metode (28).

Grenseverdiene til et referanseområde finner vi ved å rangere prøveverdier i stigende rekkefølge i en tabell. Tabellen skulle gi en oversikt over hvor ofte hver verdi forekommer. Referanseområdet på 95 % finner vi ved å regne ut områdene under 2,5 % og over 97,5 % ved å bruke følgende formler:

$0,025x(n+1)$  for området under 2,5 %

$0,975x(n+1)$  for området over 97,5 %

Referanseområdet bestemmes ved å ta resultatet fra beregningene og finne verdiene som samsvarer med tallene fra rangeringen. Disse tallene vil være start og sluttpunkter for referanseområde. Referanseområdet er et intervall på skalaen (aksen) mellom disse tallene (29).

### **1.7.2 Analysevariasjon.**

En analysemetode vil alltid variere fra analyse til analyse. For å sikre oss at variasjonen på de prøveresultatene vi får skal bli minst mulig må alle analyseprosedyrer utføres presist og nøyaktig. Det er analysevariasjons-koeffisient (CV %) uttrykker variasjonen (30).

Presisjon og nøyaktighet er viktig for hver analysemetode. For å teste om metoden er presis og nøyaktig analyserer en samme prøve mange ganger med denne metoden. Presisjon eller evnen til å få samme svar ved gjentatte analyser av samme prøve, kan uttrykkes ved standardavviket. Et liten standardavvik betyr god presisjon. Nøyaktighet eller evnen til å treffe nær sann verdi, kan uttrykkes ved middelveidien. Om metoden er nøyaktig, vil middelveidien ligge nær prøvens sanne verdi (28).

En systematisk feil (feil som alltid slår ut samme vei fra den sanne verdien) vil gi metoden dårlig nøyaktighet. Systematisk feil er alltid til stede i alle prøvene i en serie. Systematisk feil kan være en feil innstilt pipetten. Systematisk feil forskyver middelveidien bort fra den sanne verdien.

En tilfeldig feil (feil som slår ut begge veier) gir metoden dårlig presisjon. Tilfeldig feil kan skyldes forskjeller i pipetteringsteknikk. Tilfeldige feil får de observerte verdiene fordele seg omkring middelveidien (28).

Summen av systematiske og tilfeldige feil i en metode defineres som total feil. Total feil informasjon er en verdifull informasjon i hvert forsøk. Den hjelper å identifisere kilden til feil og reduserer omfanget (28).

### **1.7.3 Kalibreringskurve.**

Før analyse blir utført er det nødvendig å vurdere om analysemetoden kan brukes uten justeringer. Da det er å bestemme analytisk range til hjelp. Analytisk range er det konsentrasjons-området hvor metoden kan brukes uten modifikasjon (28). Selve begrepet er synonymt med linearitetsområde. Ved hjelp av kalibreringskurve (hvor målte verdier plottes på y-aksen og de sanne verdier på x-aksen) bestemmes metodens linearitet (28). Kalibreringskurven skulle bli lineær og skulle ideelt sett passere gjennom origo punktet. Korrelasjons-analyse påviser i denne tilfelle lineær avhengighet mellom variablene (korrelasjon). Dersom korrelasjonskoeffisienten er lik -1 eller 1 så er det lineær sammenheng mellom de to variablene (28). En korrelasjonskoeffisient nær null betyr at det ikke finnes noen lineær sammenheng mellom de to variablene (28).

Ved hjelp av et dataprogram får vi formelen ( $y=ax+b$ ) til den linjen som passer best med måledataene. Regresjonskoeffisienten ( $R^2$ ) viser hvor godt kurven treffer på alle målepunktene.  $R^2$  skulle bli så nær 1 som mulig (28).

### **1.7.4 Deteksjons-grense.**

Hver analysemetode har sine egne deteksjons-grenser eller den laveste konsentrasjon som kan detekteres ved analyse. Deteksjons-grensen er et mål på den minste konsentrasjonen av en analytt som kan skilles fra en blankprøve (28). Blankprøve er en løsning av reagenser uten den prøven som skal analyseres. De blanke prøver analyseres samtidig med de ukjente prøvene. Løsningene av reagenser i de blanke prøvene bør ha samme sammensetning som løsninger til måling av ukjente prøver. Analyseresultater refereres til blanke prøver (28).

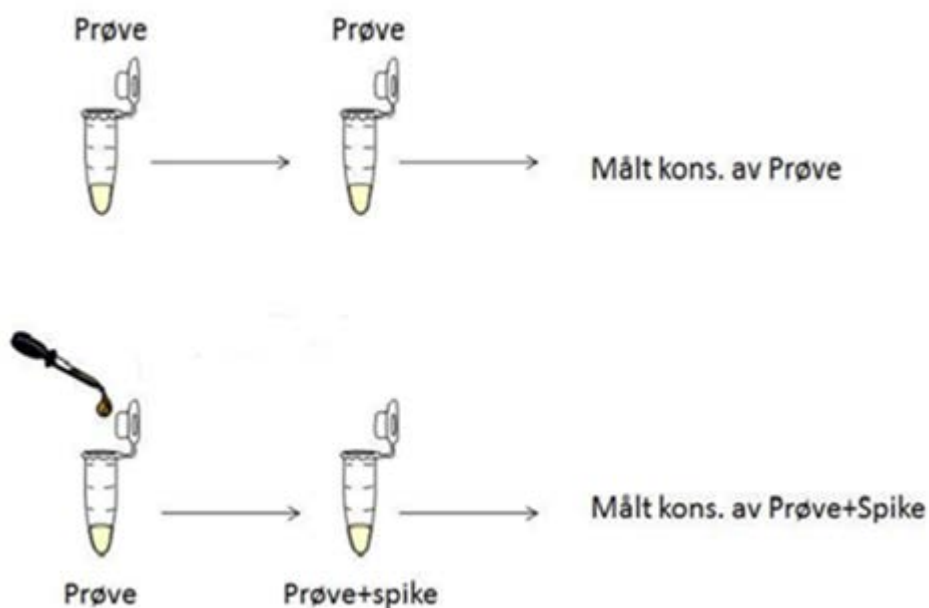
### 1.7.5 Gjenfinning.

Gjenfinning er et mål på metodens nøyaktighet (30). Den målte konsentrasjon av analytt i en prøve stemmer ikke alltid med den sanne konsentrasjonen i prøven. En kan gjøre forsøk der man tilsetter en kjent mengde av analytt til en prøve (prøven blir “spiket”(Figur 6)) og når prøven er analysert beregnes det forholdet mellom målt konsentrasjon og den tilsatte konsentrasjonen. Hvis gjenfinning er på hundre prosent vil den målte konsentrasjonen være lik den tilsatte konsentrasjonen. Formel 1 og 2 brukes for å beregne gjenfinning (30).

$$\text{Målt mengde analytt} = \text{Kons.}(\text{Prøve+Spike}) - \text{Kons.}(\text{Prøve}) \quad (1)$$

$$\text{Gjenfinning} = \frac{\text{Målt mengde analytt}}{\text{Tilsatt mengde analytt}} \times 100\% \quad (2)$$

Gjenfinningen viser hvor stor prosent av prøvens sanne verdi som metoden klarer å finne igjen (30).



$$\text{Kjent kortisolkonsentrasjon} + \text{prøve} = \text{Prøve+spike}$$

Figur 6: Gjenfinnings-metoden (31).

### 1.8 Kortisolutvinning.

Steroid-metabolitter som er til stede i en laksefeces er av varierende polaritet og sammensetning (31), derfor valget av en passende ekstraksjons-metode er viktig. Metode for kortisol utvinning skulle være så enkelt som mulig, slik at metoden kunne lett brukes i hver oppdrett. Det er to aktuelle metoder: kortisol ekstraksjon av ferske og tørr feces.

Forskere, som analyserer kortisol-nivå i feces hos dyr anbefaler å bruke ferske feces i kortisol analysen etter en enkelt ekstraksjon prosedyren, hvor kortisol ekstraheres ved direkte blanding av ferske feces i en 90 % metanol. Feces prøver samles og homogeniseres for å fordele hormoner gjennom prøvene. Etter homogenisering ekstraheres den våte prøven med 90 % metanol ved forsiktig risting over natten ved 20°C (31). Noen av forskere bruker mindre tid i dette trinnet: 5 minutt i vortex-blanding ved romtemperatur og 20 minutter i inkubering i en termostatisk oscillator ved 60°C (32). Etter inkuberingen skulle prøven sentrifugeres 20 minutt og resulterende supernatant overføres til en rent rør og lagres ved -20°C inntil analyse.

Bruk av tørket feces til kortisol ekstraksjon er litt mer komplisert og trenger litt ekstra forberedelser. Etter grundig homogenisering skulle feces prøver tørkes ut (frysetørkes ut i et vakuum ved -60°C, 24 timer (33)). Uttørket til jord avføring grundig ekstraheres med 90 % etanol ved hjelp av oscillasjon 20 min. Hver prøve sentrifugeres i 20 min og supernatanter inndampes til tørrhet ved 60°C (33,34). Prøver oppløses i metanol, og disse løsninger overføres til en sterilt mikrosentrifuge rør og lagres ved -20°C før testing (33).

Forskere Palme og Touma (31) anbefaler å bruke våt, heller enn tørr til utvinningsmetoder, fordi litteraturen antyder, at tørkeprøver ikke var bedre etter utvinningsprosedyren (spesielt med tanke på hvis prøvene, som skal analyseres, er store og samlet nesten umiddelbart etter avføring (31)). Palme og Touma sier, at det er best å trekke ut avførings steroider ved blanding feces og en 80 % metanol. De peker på, at denne ekstraksjons-prosessen er meget enkel å bruke, ingen fordamping er nødvendig og prosessen gir et høyt utbytte og nøyaktighet (31).

Det er forskjellige metoder for kortisol utvinning. I denne oppgaven skal det etterprøves kortisol ekstraksjon av tørr laksefeces ved hjelp av gjenfinning metoden.

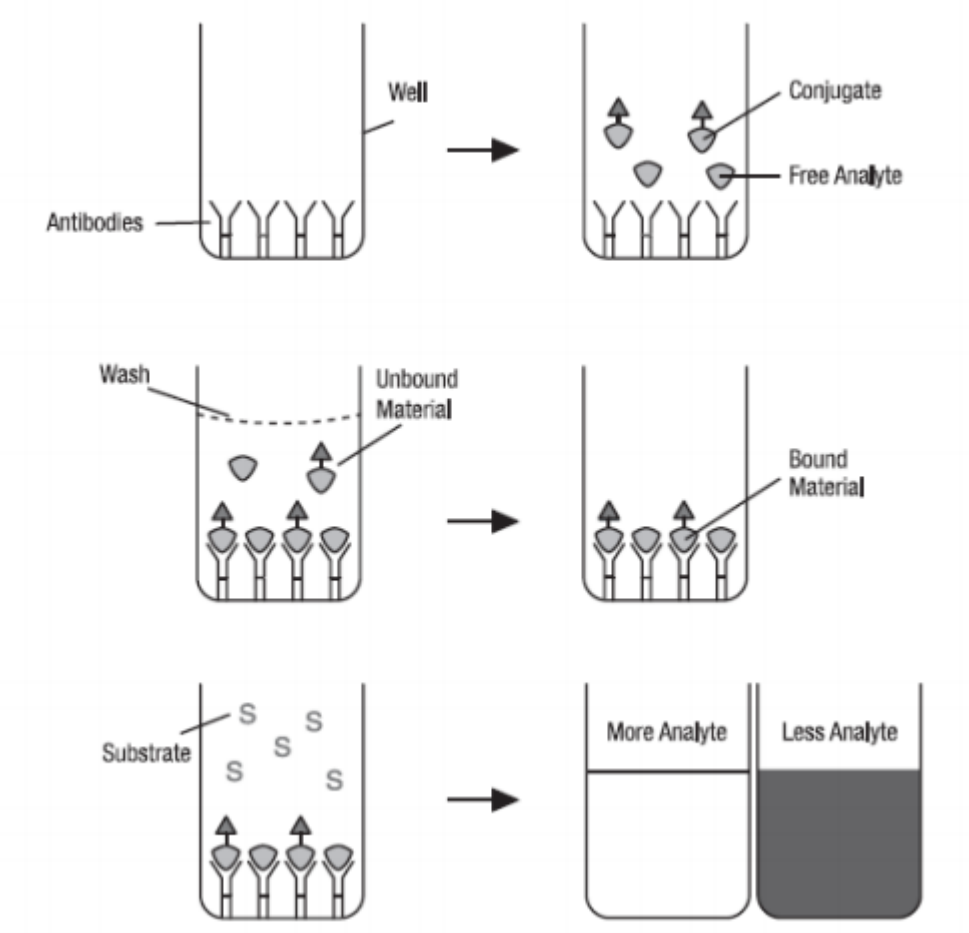
## **1.9 Kvantitativ analyse av kortisol-ELISA.**

For kvantitativ analyse av kortisol-nivåer i biologiske væske brukes ELISA. ELISA står for Enzyme-linked immunosorbent assay og en immunologisk analysemetode, hvor benyttes antistoffer som er spesifikke mot det proteinet en ønsker å detektere (35). Et ELISA-kit består av mikroplate og reagenser. Mikroplate er en ramme og tolv rekker med åtte brønner i hver rekke.

På en plate er det 96 mikrobrønner. Alle kjemiske reaksjonene foregår der. Hver brønn er på forhånd dekket med antistoff som er spesifikke mot kortisol. Prøver og standarder tilsettes til brønner og kortisol som er til stede i prøven vil binde seg til antistoffene (35). Fortynnet enzymkonjugat tilsettes til standarder og prøver i brønnene. Blandingen ristes og inkuberes ved romtemperatur i en time.

Det er konkurranse mellom enzymkonjugat og kortisol i prøven for begrenset antall av bindingssteder på antistoff-belagt plate ligger i grunnlaget av denne testen, (Figur 7). I løpet av inkubasjonstiden, er konkurranse om bindingssteder finner sted. Platen vaskes for å fjerne alt ubundet materiale. Det bundne enzymkonjugatet detekteres av tilsetning av substrat som frembringer en optimal farge etter 30 minutter. Konsentrasjonen av kortisol i prøver måles ved hjelp av mikroplate-avleser ved 450 nm bølgelengde. Intensiteten av den genererte fargen er omvendt proporsjonal med mengden av kortisol i prøve eller standard (35). For eksempel vil fraværet av kortisol i prøven resultere i en lys blå farge, mens nærværet av kortisol vil resultere i redusert eller ingen fargeutvikling (35).





Figur 7: Analyseprinsipp for ELISA-metoden (35).

## 2. Materialer og metoder.

### 2.1 Prøve innsamling.

Til forsøket ble det brukt feces prøver, som ble stryket ut av laks fra et oppdrettsanlegg i Romsdalsfjorden i forbindelse med lusetelling.

### 2.2 Materialer for kortisol ekstraksjon:

- Sterile glassbeholdere, rør
- Varmeovn
- 80 % EtOH
- Vortex
- Vakuum container

### 2.3 Materialer for kortisol analyse:

Neogen, Cortisol ELISA Kit Lot 0150 Exp.:18.05.16

- Kortisol antistoffbelagt Mikroplate Lot 150213 Exp.dato 13.02.17.
- EIA Buffer
- Vaskebuffer
- K-Blue substratt
- Ekstraksjon buffer
- Kortisol enzymkonjugat
- Kortisol standard

Andre nødvendige materialer:

- Destillert vann
- Pipetter fra 10 $\mu$ L-1000 $\mu$ L
- Engangsspisser
- Multikanal pipette
- Gradert sylinder
- Mikroplateleser
- Plastfilm
- HCl 1M
- Vortex

### 2.4 Prosedyre.

#### 2.4.1 Prosedyre for gjenfinning metode og kortisol ekstraksjon.

For en gjenfinning metoden ble det brukt prosedyre for ekstraksjon av kortisol av tørr feces. Prosedyren finnes i vedlegg 1.

#### 2.4.2 Prosedyre for kortisolanalyse med ELISA.

Alle prøvene ble analysert med Neogen Cortisol ELISA-kit.

Prosedyrebeskrivelsen er i vedlegg 2.

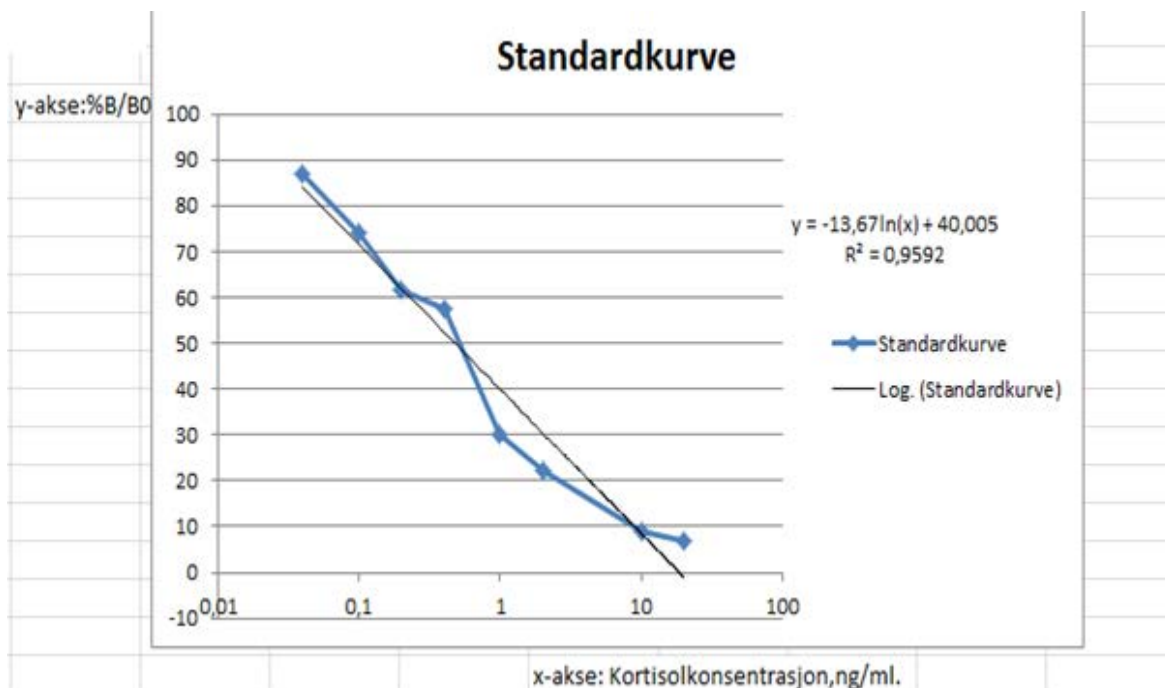
### 3. Resultat.

Til gjenfinningsforsøket ble det tatt 4 fecesprøver og laget 3 paralleller. Prøver og standarder ble analysert med Neogen Cortisol ELISA-kit. Alle prøvene ble analysert i paralleller. Det ble regnet ut en snittverdi for absorbans per prøve basert på parallellene. Standardprøvene ble brukt til å lage en standardkurve, som dannet grunnlag for omregning fra absorbans til konsentrasjon ng/ml. Det ble regnet ut prosent av maksimal binding (%B/B0) til å lage en standardkurve. Tabell 3.1 gir oversikt over målte absorbanseverdier, standardens kortisolkonsentrasjon og beregnet prosent av maksimal binding.

**Tabell 3.1:** Absorbanseverdier for standardrekken og beregnet prosent av maksimal binding (%B/B0) for standardkurve.

<b>Standarder</b>	<b>Konsentrasjon av kortisol,ng/ml</b>	<b>Absorbans (450nm)</b>	<b>%B/B0</b>
<b>S0 (B0)</b>	0	2,15	
<b>S1 (B1)</b>	0,04	1,868	86,88
<b>S2 (B2)</b>	0,1	1,59	73,95
<b>S3 (B3)</b>	0,2	1,32	61,48
<b>S4 (B4)</b>	0,4	1,238	57,58
<b>S5 (B5)</b>	1	0,647	30,09
<b>S6 (B6)</b>	2	0,482	22,41
<b>S7 (B7)</b>	10	0,192	8,93
<b>S8 (B8)</b>	20	0,147	6,83

Ved hjelp av data ble det tegnet standardkurve og en trendlinje, samt funnet formelen og regresjonskoeffisient ( $R^2$ ), (Figur 3.1). Formelen ble brukt til beregning av kortisolkonsentrasjon.



**Figur 3.1:** Standardkurve og formelen.

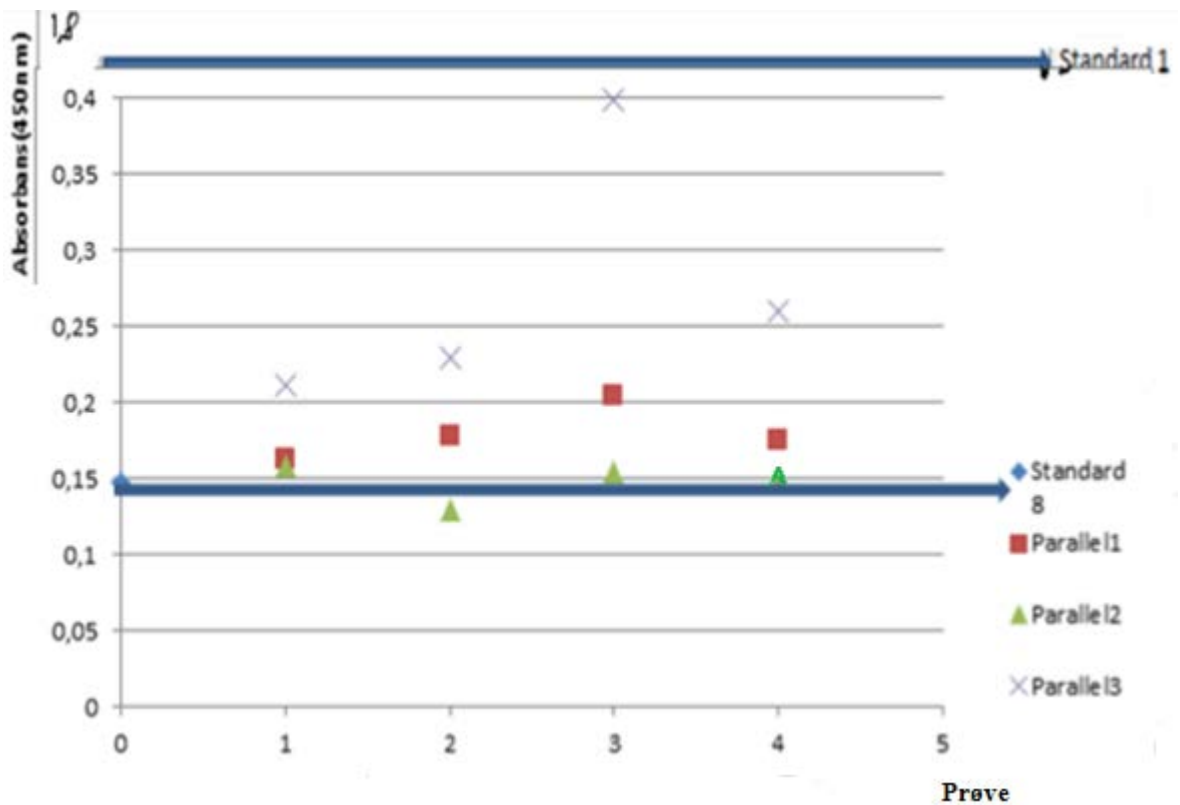
Tabell 3.2 gir oversikt over de målte absorbanverdiene, beregnet % av maksimal binding og kortisolkonsentrasjon hos prøvene i gjenfinningsforsøk. Ved beregning av kortisolkonsentrasjon ble det brukt standardkurveformelen.

**Tabell 3.2:** Målte absorbanverdier etter analyse av 4 fecesprøver med paralleller og beregnet prosent av maksimal binding (%B/B0) og kortisolkonsentrasjon (ng/ml) for prøver i gjenfinningsforsøk.

Prøve	Parallell	Absorbans	%B/B	Kortisolkonsentrasjon, ng/ml
1	1.1	0,163	7,58	10,71

	1.2	0,159	7,40	10,86
	1.3	0,211	9,81	9,10
<b>2</b>	2.1	0,178	8,28	10,18
	2.2	0,129	6,00	12,03
	2.3	0,23	10,70	8,53
<b>3</b>	3.1	0,204	9,49	9,32
	3.2	0,154	7,16	11,05
	3.3	0,399	18,56	4,80
<b>4</b>	4.1	0,175	8,14	10,29
	4.2	0,147	6,84	11,31
	4.3	0,26	12,09	7,70

Figuren 3.2 gir oversikt over absorbanseverdier av fecesprøvene i gjenfinningsforsøk. Figuren viser at de målte absorbanseverdiene (unntatt ett: prøve 2 parallell 2) ligger innenfor det analytiske området. Det er mellom de nedre (Standard 8) og øvre (Standard 1) grensene er verdiene for målområdet, og det er spekteret som standardkurven omfatter.



**Figur 3.2:** Oversikt over absorbanseverdier av fecesprøvene i gjenfinningsforsøk.

Det ble beregnet % gjenfinning ved hjelp av formler i delkapittel 1.7.5 samt regnet ut gjennomsnitt % gjenfinning i tabell 3.3

**Tabell 3.3:** Beregnet gjenfinning, %

Prøve	1	2	3	4	Gjennomsnitt gjenfinning, %
<b>Parallell 1</b>	16,1	16,5	45,2	25,9	25,9
<b>Parallell 2</b>	17,6	35,0	62,5	36,1	49,3

Det ble beregnet prosent av kortisolmengden som ikke ble oppdaget i hvert trinn av metoden, (Tabell 3.4).

**Tabell 3.4:** Mengde av kortisol %, som ble ikke oppdaget av metoden i de to trinnene i tørrmetodeutvinning, %

Prosesstrinn	% mistet kortisolmengde
Tørking	23,4
Ekstraksjon	50,7

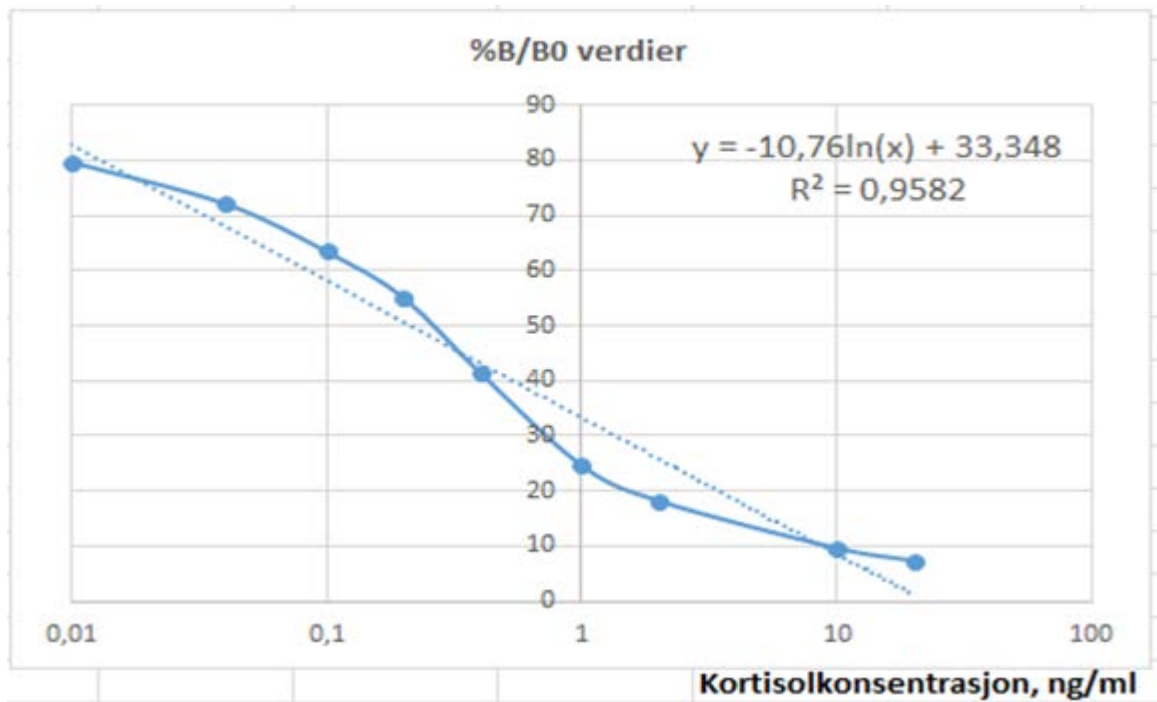
Til etablering av referanseområde ble det analysert 200 fecesprøver ved hjelp av ELISA-metoden. Det var samlet inn 10 prøver per måned i ett år. Alle prøvene ble analysert i paralleller. Det ble regnet ut en snittverdi for absorbans per prøve basert på parallellene. Standardprøvene ble brukt til å lage en standardkurve, som dannet grunnlag for omregning fra absorbans til konsentrasjon ng/ml. Det ble regnet ut prosent av maksimal binding (%B/B0) til å lage en standardkurve.

**Tabell 3.5:** Absorbansverdier og beregnet prosent av maksimal binding (%B/B0) for standardkurve til beregning av kortisolkonsentrasjon i fecesprøver for etablering av referanseområde.

Standard	Konsentrasjon av kortisol, ng/ml	Absorbans (450 nm)	%B/B0
S0 (B0)	0	2,068	
S1	0,01	1,647	79,7
S2	0,04	1,491	72,1
S3	0,1	1,312	63,4
S4	0,2	1,140	55,1
S5	0,4	0,857	41,5
S6	1	0,511	24,7
S7	2	0,377	18,2
S8	10	0,200	9,7

S9	20	0,153	7,4
----	----	-------	-----

Ved hjelp av data ble det tegnet standardkurve, trendlinjen og funnet formelen til beregning av kortisolkonsentrasjon,(Figur 3.3).



**Figur 3.3:** Standardkurve og formelen.

Ved hjelp av standardkurveformelen ble det beregnet kortisolkonsentrasjon i fecesprøvene. Tabell 3.6 gir oversikt over målte absorbanseverdier og beregnet konsentrasjon av kortisol i de 200 fecesprøvene.



**Tabell 3.6:** Oversikt over beregnet % B/B0 og konsentrasjon av kortisol, ng/ml i prøvene for å beregne referanseområde.

<b>N</b>	<b>Måned</b>	<b>Absorbans</b>	<b>%B/B0</b>	<b>Kortisolkons., ng/ml</b>
1	3	0,189	9,12	9,5
2	3	0,207	9,99	8,76
3	3	0,223	10,78	8,14
4	3	0,276	13,33	6,43
5	3	0,305	14,75	5,63
6	3	0,305	14,75	5,63
7	3	0,236	11,43	7,67
8	3	0,272	13,14	6,54
9	3	0,24	11,62	7,53
10	3	0,254	12,27	7,09
11	3	0,242	11,72	7,46
12	3	0,245	11,85	7,37
13	3	0,234	11,3	7,76
14	3	0,246	11,91	7,33
15	3	0,214	10,36	8,46
16	3	0,188	9,07	9,54
17	3	0,245	11,86	7,36
18	3	0,237	11,46	7,64
19	3	0,252	12,2	7,14
20	3	0,237	11,48	7,63
21	4	0,298	14,39	5,82
22	4	0,306	14,81	5,6
23	4	0,349	16,88	4,62
24	4	0,352	17,04	4,55
25	4	0,323	15,62	5,19
26	4	0,293	14,18	5,93
27	4	0,269	12,99	6,63
28	4	0,228	11,03	7,96
29	4	0,222	10,75	8,17
30	4	0,206	9,95	8,8
31	4	0,211	10,2	8,59
32	4	0,192	9,27	9,37
33	4	0,266	12,86	6,71
34	4	0,269	13,01	6,62
35	4	0,232	11,22	7,82
36	4	0,226	10,91	8,04
37	4	0,206	9,96	8,79
38	4	0,192	9,3	9,34
39	4	0,243	11,75	7,44
40	4	0,232	11,2	7,83

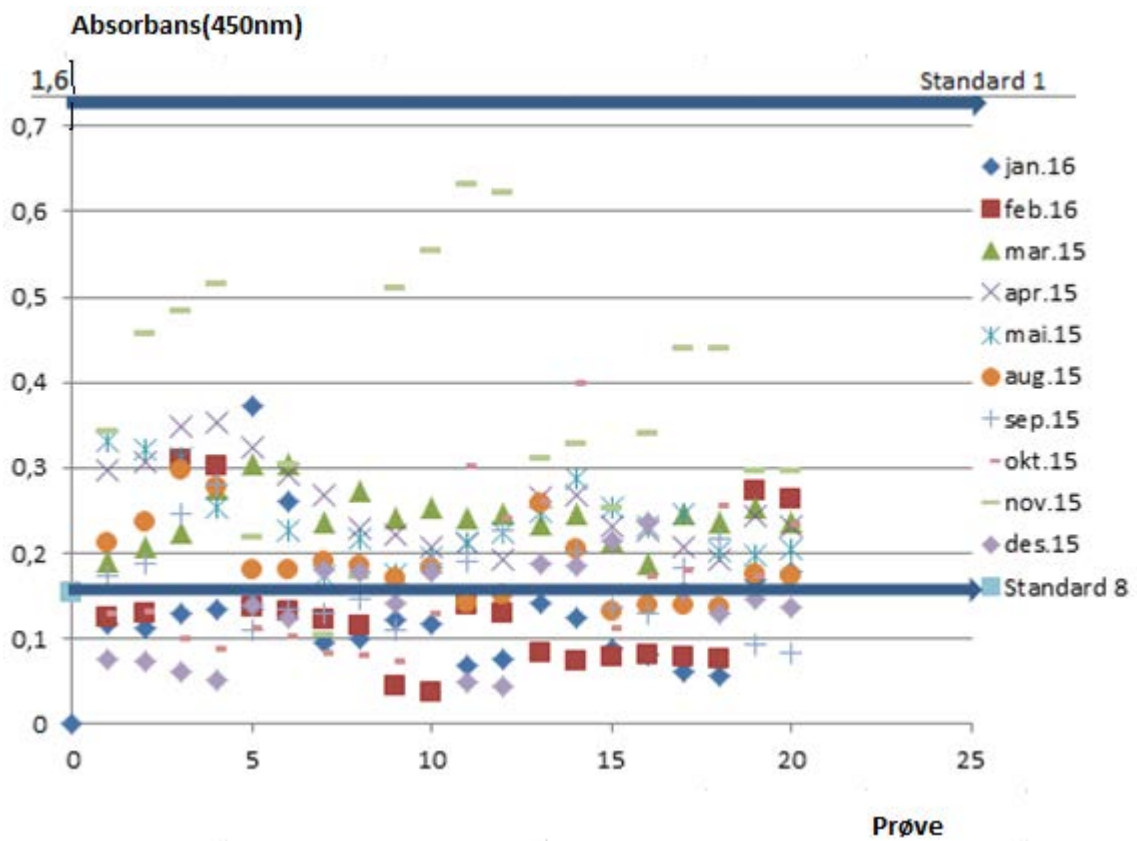
41	5	0,332	16,04	5
42	5	0,322	15,57	5,22
43	5	0,312	15,1	5,45
44	5	0,252	12,19	7,15
45	5	0,145	7,01	< Std 8
46	5	0,227	10,96	8,01
47	5	0,173	8,38	10,18
48	5	0,216	10,44	8,4
49	5	0,175	8,45	10,12
50	5	0,194	9,4	9,26
51	5	0,212	10,27	8,54
52	5	0,224	10,85	8,09
53	5	0,248	11,98	7,29
54	5	0,288	13,91	6,09
55	5	0,253	12,25	7,1
56	5	0,231	11,19	7,84
57	5	0,246	11,88	7,35
58	5	0,201	9,7	9
59	5	0,197	9,53	9,15
60	5	0,205	9,9	8,84
61	8	0,213	10,3	8,51
62	8	0,237	11,46	7,64
63	8	0,298	14,41	5,81
64	8	0,278	13,44	6,36
65	8	0,181	8,75	9,83
66	8	0,181	8,75	9,83
67	8	0,191	9,21	9,42
68	8	0,184	8,9	9,7
69	8	0,171	8,24	10,31
70	8	0,183	8,82	9,77
71	8	0,141	6,82	< Std 8
72	8	0,152	7,33	< Std 8
73	8	0,258	12,45	6,97
74	8	0,204	9,86	8,87
75	8	0,132	6,38	< Std 8
76	8	0,139	6,72	< Std 8
77	8	0,14	6,77	< Std 8
78	8	0,136	6,55	< Std 8
79	8	0,175	8,46	10,1
80	8	0,172	8,32	10,24
81	9	0,174	8,39	10,17
82	9	0,187	9,04	9,57
83	9	0,245	11,85	7,37
84	9	0,281	13,59	6,27

85	9	0,11	5,29	< Std 8
86	9	0,135	6,53	< Std 8
87	9	0,13	6,29	< Std 8
88	9	0,145	7,01	< Std 8
89	9	0,109	5,25	< Std 8
90	9	0,187	9,04	9,57
91	9	0,191	9,24	9,4
92	9	0,226	10,9	8,05
93	9	0,187	9,04	9,57
94	9	0,201	9,7	9,01
95	9	0,136	6,58	< Std 8
96	9	0,129	6,24	< Std 8
97	9	0,183	8,85	9,74
98	9	0,217	10,49	8,36
99	9	0,092	4,45	< Std 8
100	9	0,084	4,04	< Std 8
101	10	0,128	6,17	< Std 8
102	10	0,131	6,31	< Std 8
103	10	0,1	4,81	< Std 8
104	10	0,087	4,18	< Std 8
105	10	0,112	5,39	< Std 8
106	10	0,102	4,93	< Std 8
107	10	0,082	3,94	< Std 8
108	10	0,081	3,92	< Std 8
109	10	0,072	3,48	< Std 8
110	10	0,129	6,21	< Std 8
111	10	0,303	14,65	5,68
112	10	0,242	11,68	7,49
113	10	0,26	12,57	6,89
114	10	0,399	19,29	3,69
115	10	0,112	5,42	< Std 8
116	10	0,174	8,39	13,41
117	10	0,181	8,75	9,83
118	10	0,256	12,38	7,02
119	10	0,172	8,32	10,24
120	10	0,233	11,24	7,8
121	11	0,344	16,61	4,74
122	11	0,458	22,15	2,83
123	11	0,485	23,45	2,51
124	11	0,516	24,95	2,18
125	11	0,218	10,54	8,33
126	11	0,304	14,7	5,66
127	11	0,104	5	< Std 8
128	11	0,174	8,39	10,17

129	11	0,511	24,71	2,23
130	11	0,554	26,79	1,84
131	11	0,632	30,54	1,3
132	11	0,623	30,1	1,35
133	11	0,312	15,06	5,47
134	11	0,329	15,88	5,07
135	11	0,252	12,16	7,16
136	11	0,341	16,47	4,8
137	11	0,44	21,25	3,08
138	11	0,44	21,25	3,08
139	11	0,298	14,39	5,82
140	11	0,298	14,39	5,82
141	12	0,075	3,6	< Std 8
142	12	0,072	3,46	< Std 8
143	12	0,062	2,97	< Std 8
144	12	0,051	2,47	< Std 8
145	12	0,14	6,77	< Std 8
146	12	0,125	6,04	< Std 8
147	12	0,181	8,73	9,85
148	12	0,178	8,58	9,99
149	12	0,142	6,84	< Std 8
150	12	0,178	8,61	9,96
151	12	0,05	2,39	< Std 8
152	12	0,044	2,1	< Std 8
153	12	0,188	9,09	9,53
154	12	0,185	8,92	9,68
155	12	0,214	10,32	8,5
156	12	0,236	11,41	7,68
157	12	0,156	7,52	11,03
158	12	0,13	6,26	< Std 8
159	12	0,146	7,06	< Std 8
160	12	0,137	6,6	< Std 8
161	1	0,118	5,71	< Std 8
162	1	0,111	5,34	< Std 8
163	1	0,13	6,29	< Std 8
164	1	0,135	6,53	< Std 8
165	1	0,373	18,04	4,15
166	1	0,26	12,55	6,91
167	1	0,095	4,57	< Std 8
168	1	0,1	4,81	< Std 8
169	1	0,123	5,92	< Std 8
170	1	0,116	5,61	< Std 8
171	1	0,068	3,26	< Std 8
172	1	0,075	3,63	< Std 8

173	1	0,142	6,87	< Std 8
174	1	0,125	6,04	< Std 8
175	1	0,088	4,26	< Std 8
176	1	0,081	3,89	< Std 8
177	1	0,06	2,9	< Std 8
178	1	0,057	2,76	< Std 8
179	1	0,167	8,08	10,47
180	1	0,178	8,58	9,99
181	2	0,124	6	< Std 8
182	2	0,129	6,21	< Std 8
183	2	0,309	14,94	5,53
184	2	0,301	14,53	5,75
185	2	0,137	6,62	< Std 8
186	2	0,132	6,36	< Std 8
187	2	0,121	5,85	< Std 8
188	2	0,114	5,51	< Std 8
189	2	0,045	2,18	< Std 8
190	2	0,037	1,79	< Std 8
191	2	0,139	6,72	< Std 8
192	2	0,129	6,21	< Std 8
193	2	0,084	4,04	< Std 8
194	2	0,074	3,55	< Std 8
195	2	0,079	3,8	< Std 8
196	2	0,08	3,84	< Std 8
197	2	0,077	3,7	< Std 8
198	2	0,075	3,6	< Std 8
199	2	0,273	13,2	6,5
200	2	0,263	12,72	6,8

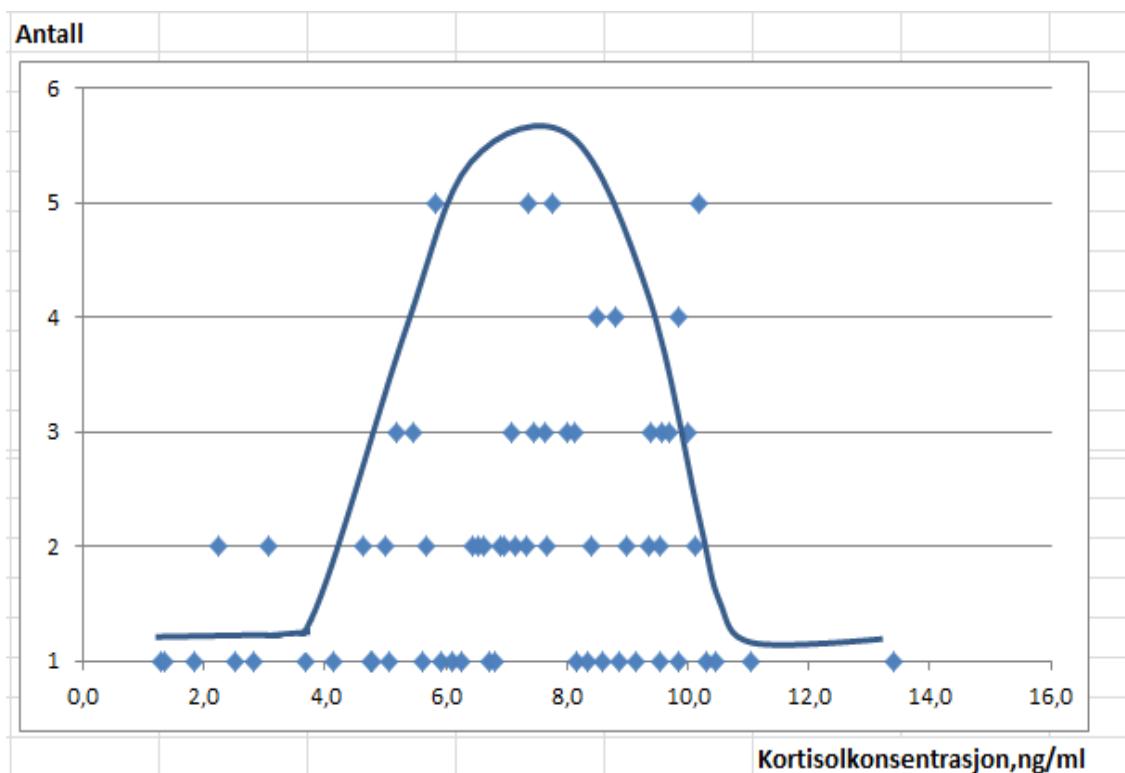
Figur 3.4 gir oversikt over absorbanseverdier av 200 fecesprøver. Figuren viser at nesten alle absorbanseverdiene ligger innenfor det analytiske området (det spekteret som standardkurven omfatter). Grenser for analytisk område: øverste grense er Standard1 med absorbanse 1,647, og nederste grense er Standard 8 med absorbanse 0,15. Alle absorbanseverdiene som ligger utenfor det analytiske området ble ekskludert.



**Figur 3.4:** Oversikt over absorbanseverdier av 200 fecesprøver.

For å få oversikt over fordelingen ble det tegnet histogram,(Figur 3.5).

Histogrammet viser normal fordeling.



**Figur 3.5:** Histogram. Oversikt over fordelingen.

Histogram viser at verdiene er normalt fordelt, derfor ble referanseområde bestemt ved hjelp av interpersentil-intervall. Prøveverdier ble rangert i stigende rekkefølge i tabell 3.7. Ved hjelp av formler (som en finner i delkapittel 1.7.1.) ble det beregnet referansegrenser.

**Tabell 3.7:** Rangering av prøveverdier i stigende rekkefølge for å beregne referanseområde for kortisolkonsentrasjon i laksefeces. Beregnet referanseområde merket med gul farge.

Kortisolkons.	Antall
1,3	1
1,4	1
1,8	1
2,2	2
2,5	1
2,8	1
3,1	2
3,7	1
4,2	1
4,6	2
4,7	1

4,8	1
5,0	2
5,1	1
5,2	3
5,5	3
5,6	1
5,7	2
5,8	5
5,9	1
6,1	1
6,3	1
6,4	2
6,5	2
6,6	2
6,7	1
6,8	1
6,9	2
7,0	2
7,1	3
7,2	2
7,3	2
7,4	5
7,5	3
7,6	3
7,7	2
7,8	5
8,0	3
8,1	3
8,2	1
8,3	1
8,4	2
8,5	4
8,6	1
8,8	4
8,9	1
9,0	2
9,2	1
9,3	2
9,4	3
9,5	2
9,5	1
9,6	3
9,7	3
9,8	4



9,9	1
10,0	3
10,1	2
10,2	5
10,3	1
10,5	1
11,0	1
13,4	1
Antall prøver	128

**Beregning av referansegrensene:**

Den nederste grense:  $0,025 \cdot (128+1) = 3,22$  eller 3

Den øverste grense:  $0,975 \cdot (128+1) = 125,77$  eller 126

Referanseområde for kortisol ligger mellom 1,8-10,5 ng/ml

## 4. Diskusjon.

Målet for denne oppgaven er å finne ut om det er mulig å bruke kortisol som en velferdsindikator i oppdrett, samt finne ut hvilken metode for ekstraksjon av kortisol som er best egnet for fecesprøver.

I følge litteraturanalysen i teoridelen av oppgaven er kortisol den beste indikatoren for fiske-velferd. Ved å måle kortisol-nivå i laksefeces er det mulig å vurdere fiskens helsetilstand og konkludere om velferden i oppdrett. Det er viktig å finne de riktige analysemetodene for kortisol-nivå måling. Derfor er validering av analysemetoder nødvendig før de tas i bruk.

Det er to måter å ekstrahere kortisol av: å ekstrahere kortisol direkte av fersk feces og av tørket feces. I oppgaven ble det prøvd å finne ut om er det mulig å bruke ekstraksjon av kortisol av tørr feces og metoden ble validert. Det ble utført et forsøk for å kontrollere effektiviteten av en kortisolekstraksjon av tørket feces ved hjelp av gjenfinning. Gjenfinning metoden er beskrevet i teoridelen av oppgaven og generelt prinsippet av metoden vist i figur 6. Målet ved forsøket var å finne ut hvordan kortisolemengden i feces blir påvirket av tørking og selve ekstraksjonen.

Det ble tatt 4 laksefeces prøver og laget 3 paralleller av hver prøve. Parallell 1 ble spiket med 10  $\mu$ l kortisol før tørking. I parallell 2 ble det tilsatt 10 $\mu$ l kortisol før ekstraksjon. Parallell 3 inneholder kontroll feces prøve. Prøvene ble analysert med Neogen Cortisol ELISA-kit. Tabell 3.1 viser de målte absorbanser til standarder og beregnet prosent av maksimal binding for standardkurve. Det ble tegnet en standardkurve, (Figur 3.1) og ved hjelp av data ble funnet formelen, som ble brukt til kortisolkonsentrasjon beregning. Oversikt over absorbanser og beregnet konsentrasjon av kortisol i de 4 prøvene i tabell 3.2. Analytisk område i denne metoden er begrenset på grunn av standardkurve. Den øverste grensen er Standard 1 med absorbansen 1,868. Den nederste grensen er Standard 8 med absorbansen 0,147. Figur 3.2 gir oversikt over beliggenhet av absorbans verdier til de 4 feces prøvene med 3 paralleller. Alle absorbanseverdier, unntatt absorbansen til prøve 2 parallell 2, ligger innenfor det analytiske området. Verdiene som ligger utenfor det spekteret som standardkurven omfatter ble ekskludert.

Ved hjelp av formler 1 og 2 (delkapittel 1.7.5) ble det beregnet % gjenfinning, (Tabell 3.3). Det er 25,9 % gjenfinning i parallell 1 og 49,3 % gjenfinning i parallell 2.

En kan se at % gjenfinning av prøve 1 parallell 2 er mye lavere enn de andre verdiene i samme rekke. Dette skjedde på grunn av feil pipettering, derfor ble prøven ikke tatt med ved beregningen av gjennomsnittet. Det ble heller ikke tatt med prøve 2 parallell 2 på grunn av at absorbansen < Standard 8.

Det ble beregnet prosent av kortisolmengden som ikke ble oppdaget i hvert trinn av metoden, (Tabell 3.4). Ut fra tabellen kan vi se at ved ekstraksjonstrinnet ble det mistet mest av kortisolmengden (50 %). Dette tyder på at kortisolmengden sterkt reduseres mens den går gjennom tørke-trinn og ekstraksjon. Metoden klarte å finne bare 25,9 % av tilsatte mengden av kortisol. Metodens ekstraksjons effektivitet er for lav.

Det er mulig at analysering av 4 prøver er for lite for å slå noe fast med 100 % sikkerhet. Det er nødvendig å analysere mer enn 4 prøver. Kortisolekstrahering av tørket feces har mange manuelle prosedyrer, som gir stor analysevariasjon. Manuelle trinn gir rom til mange tilfeldige og systematiske feil. Tørke-trinn og fordamping er for å fjerne fett og andre organiske materiale, som kan påvirke analyseresultatet. Men hvis prøvene skal analyseres med ELISA-metoden, blir tørrmetoden, med sin lave ekstraksjonseffektivitet, ikke aktuell. ELISA er en spesifikk metode som er god til å detektere og analysere en bestemt analytt uten å bli påvirket av andre prøvekomponenter. Metoden for kortisolekstraksjon av tørr feces er altfor komplisert, har lav effektivitet og lite egner seg som ekstraksjonsmetode. Litteraturen i teoridelen i oppgaven bekrefter dette.

Mengde av kortisol- metabolitter i feces vil gi den riktige, reelle indikasjon på den generelle stress-nivå som sier mye om fiskehelsen og velferden. For å bruke kortisol som velferdsindikator er det nødvendig å finne referanseområder for et kortisol-nivå i bestemt oppdrett. Referanseområder varierer ikke bare med kjønn, alder og livs-stadium, men også med testmetode som analysen ble utført. Derfor er det viktig at hvert oppdrett har sitt eget referanseområde, som ble etablert ved bruk av samme testmetode.

Etableringen av referanseområde trengte en stor gruppe av referanseindivider, 200 feces prøver ble samlet i et oppdrettsanlegg i Romsdalsfjorden i forbindelse med luse-telling i flere måneder fra mars 2015 til februar 2016.

Kortisol ble ekstrahert og prøvene ble analysert med Cortisol ELISA-kit. Tabell 3.5 viser absorbansverdier til standarder og beregnet prosent av maksimal binding (%B/B0) for å tegne standardkurve, figur 3.3. Ved hjelp av data ble det tegnet kurvetilpasning- trendlinje og funnet formelen, som ble brukt for å beregne konsentrasjon av kortisol. Det ble beregnet regresjonskoeffisient  $R^2$ , som sier hvor godt kurvetilpasningen er. ( $R^2$  er et tall mellom 0 og 1.  $R^2$  lik 1 er skulle bli ideelt).  $R^2= 0,9582$  er noe som viser en god kurvetilpasning. Oversikt over beregnet kortisolkonsentrasjon i referanseprøver kan vi finne i tabell 3.6. ELISA-metoden har sitt analytiske område eller spekteret som standardkurven omfatter. Analytisk område er begrenset av den øverste grensen - absorbans verdier for Standard 1 og den nederste grensen - absorbans for Standard 8. Figur 3.4 gir oversikt over absorbans verdier av 200 prøver som skal brukes til beregning av referanseområde. De fleste verdiene ligger innenfor det analytiske området. Prøvene med absorbansverdiene som ligger utenfor det analytiske området ble ekskludert.

Det neste trinnet i etableringsprosessen for et referanseområde var en statistisk prosedyre. Det ble tegnet et histogram, som gir en oversikt over fordelingen, figur 3.5. Histogrammet viser en normal fordeling, som er homogen, uten avvikende verdier. Avvikende verdier eller uteliggere skulle bli eliminert hvis differansen mellom den mistenkte verdien og neste verdi overstiger 1/3 av "rangen". Referanseområde ble bestemt ved hjelp av interpercentil-intervall. Verdier av kortisol-konsentrasjoner ble rangert i stigende rekkefølge i en tabell. Tabellen 3-7 gir oversikt over hvor ofte hver verdi forekommer.

Referanseområdet ble beregnet til å ligge mellom 1,8 og 10,5 ng/ml. Det anbefales å beregne et referanseområde for vinter- månedene (når fisken spiser mindre og holder seg mest i ro- stresser ikke) og for sommer- månedene (når fisken er mer aktiv, spiser godt og legger på seg). Da kan oppdretterne få en bedre kontroll over situasjonen.

## **5. Konklusjon.**

Ut fra resultatene fra dette studiet kan en si at det er mulig å bruke kortisol som velferdsindikator i oppdrett. Kortisolekstraksjon fra tørr feces er mindre egnet for bruk, noe som ble bekreftet ved analysemetode-validering. Analyse direkte fra våt feces er best egnet for bruk i lakseoppdrett, fordi den er meget enkel å bruke og ingen fordamping er nødvendig.

Kortisolnivå-måling i feces til laks gir mulighet til å kontrollere fiskehelse og en god velferd i lakseoppdrett ved å sammenligne den målte verdien med referanseområdet.

## 6. Referanser.

1. Fiskeri-og havbruksnæringens landsforening. Rapport. *Sjømat 2025 – hvordan skape verdens fremste havbruksnæring.* (Elektronisk artikkel) 2012.05. (Hentet 2016.01.06) Tilgjengelig fra:  
[http://sjomatnorge.no/wpcontent/uploads/2014/04/Rapport\\_sm2025.pdf](http://sjomatnorge.no/wpcontent/uploads/2014/04/Rapport_sm2025.pdf)
2. Nærings- og fiskeridepartementet. *Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften)* 2008.06. (Hentet 2016.01.06) 38 sider. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>
3. Store norske leksikon. *Laks.* (Elektronisk artikkel) 14.02.2009. (Hentet 2016.01.05.) Tilgjengelig fra: <https://snl.no/laks>
4. Havforskningsinstituttet. *Lakseoppdrett* (Elektronisk artikkel). 2009.08.14. (Hentet 2016.01.10) Tilgjengelig fra:  
<http://www.imr.no/temasider/akvakultur/lakseoppdrett/nb-no>
5. Andersson E., Taranger G. L., Norberg B. Pall M. *Fisken og havet.* Kyst og havbruk. (Elektronisk artikkel). 2006. (Hentet 2016-05-05); Tilgjengelig fra:  
[https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/114106/sn\\_2006\\_02.pdf](https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/114106/sn_2006_02.pdf)
6. *Dyrevelferdsloven.* 2010. *Lov om dyrevelferd.* LOV (2009) LOV 2009-06-19 nr 97: Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2009-06-19-97>
7. Mattilsynet *Fiskevelferd.* 2016-01 (Hentet 2016-02-28); Tilgjengelig fra:  
[http://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskevelferd/](http://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/)
8. Hatløy T. *Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus – hypofyse - interrenal aksene, og dets betydning på dyrevelferden hos diploid og triploid atlantisk laksesmolt (Salmo salar L.)* Masteroppgave. Bodø; Universitet i Nordland; 05.2013; 53 sider. Tilgjengelig fra:  
<http://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/id/373782/Hatloey.pdf>
9. Lind MB. *Fluidpermeabelt luseskjørt (SalGard™) og fiskevelferd i oppdrett av atlantisk laks (Salmo Salar L.) i Nord-Norge - effektiv og skånsom ikke-medikamentell bekjempelse av lakselus?* Masteroppgave. Tromsø: UIT; 2015. 105 sider Tilgjengelig fra:  
<http://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/7749/thesis.pdf?sequence=2&isAllowed=>

10. Norges forskningsråd. *Fisk i forskning – miljøkrav og velferdsindikatorer hos fisk*. En utredning av forskningsbehovet.2009.12. Oslo; 104 sider; Tilgjengelig fra: <http://www.forskningsradet.no/servlet/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition%3A&blobheadervalue1=+attachment%3B+filename%3DFiskiforskningweb.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1274505274738&ssbinary=true>
11. Norges forskningsråd. Rapport fra styrings gruppen. *Forsknings behov innen dyrevelferd i Norge* 02.2005 (Hentet 2016.02.01.); 358 sider. Tilgjengelig fra: [http://www.forskningsradet.no/csstorage/flex\\_attachment/82-02156-4%20dyrevelferd.pdf](http://www.forskningsradet.no/csstorage/flex_attachment/82-02156-4%20dyrevelferd.pdf)
12. Ellis K.B. *The Examination of Fecal Cortisol in the Captive Southern White Rhinoceros (Ceratotherium simum simum) at the North Carolina ARaleigh, North Carolina*; 2013;(Hentet 2016.01.27) Tilgjengelig fra: <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/8791/1/etd.pdf>
13. Bruse A, Barton *Stress in Fishes: A Diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids*. Oxford Journals Science & Mathematics Integrative and Comparative Biology Volume 42, Issue 3Pp. 517-525. 2002; (Hentet 2016.04.11.) Tilgjengelig fra: <http://icb.oxfordjournals.org/content/42/3/517.full.pdf>
14. Kultiveringsveilederen. Veterinærinstituttet. *Stress og sykdom hos fisk* 13.01.11;(Hentet 2016.01.02.) 4 sider Tilgjengelig fra: <http://www.vetinst.no/Temasider/Fisk/Vill-laksefisk/Kultiveringsveilederen/Stress-og-sykdom-hos-fisk>
15. Havforskningsinstituttet. *Lakselus*.(Elektronisk artikkel), (Hentet 2016.03.17.) <http://www.imr.no/temasider/parasitter/lus/lakselus/nb-no>
16. Kunnskapscenter for laks og vannmiljø. KLV. *Lakselus*. (Elektronisk artikkel). (Hentet 2016.04.19.) Tilgjengelig fra: [http://www.klv.no/trusselbilde\\_lakselus.php](http://www.klv.no/trusselbilde_lakselus.php)
17. Forskrift om lakselusbekjempelse. *Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg*.(Elektronisk artikkel.) 07.12.2012(Hentet 2016.03.15) Tilgjengelig fra:<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140>
18. WWF. *Ordinære lusemilder mot lakselus*(Elektronisk artikkel). (Hentet 2016.03.17) Tilgjengelig fra:

- [http://www.wwf.no/dette\\_jobber\\_med/hav\\_og\\_kyst/havbruk/parasitter\\_og\\_sjukdommer/ordinare\\_lusemilder\\_mot\\_lakselus/](http://www.wwf.no/dette_jobber_med/hav_og_kyst/havbruk/parasitter_og_sjukdommer/ordinare_lusemilder_mot_lakselus/)
19. Finne A. *Stresset fisk er dårlig butikk*. Nord universitet. (Hentet 2016.02.03)  
Tilgjengelig fra: <https://www.nord.no/no/aktuelt/popularvitenskap/Sider/Stresset-fisk-er-darlig-butikk.asp>
  20. Skog Eriksen M. *Velferdsindikatorer hos fisk*.(Elektronisk artikkel) (Hentet 2016.02.05) Tilgjengelig  
fra:<http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2007/114.pdf>
  21. Lea T. *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3 utgave. Bergen. Fagbokforlaget; 2013. 400sider
  22. Haugmo Ivertsen M. *Stress hos laks*. Universitet i Nordland.(Elektronisk artikkel.) (Hentet 2016.03.03.) Tilgjengelig fra:  
[http://www.tekmar.no/konf12/foredrag/Martin%20Iversen\\_Stress%20hos%20laks.pdf](http://www.tekmar.no/konf12/foredrag/Martin%20Iversen_Stress%20hos%20laks.pdf)
  23. Wikipedia. *Kortisol*. (Hentet 2016.03.03.) Tilgjengelig  
fra:<https://no.wikipedia.org/wiki/Kortisol#/media/File:Cortisol.png>
  24. Berg J.P. *Kortisol*. Store medisinske leksikon. (elektronisk artikkel) 13.02.09 (Hentet 2016.04.16) Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/kortisol>
  25. Boberg E. *Kortisol-fysiologiske effekter*. (Elektronisk artikkel) 2016.(Hentet 2016.04.16). Tilgjengelig fra: <http://www.medinsikt.se/endokrinologi/binjuren#1>
  26. Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S. A., Minorsky P.V., Jacson R.B. *Biologi. Hormones and the endocrine system*. Pearson Education.1309 sider. 2011.s.1022-1037
  27. Store norske leksikon. *Validering*. (Elektronisk artikkel) 15.01.2015 (Hentet 2016.04.16) Tilgjengelig fra: <https://snl.no/validering>
  28. Burtis C.A, Ashwood E.R., Bruns D.E. *Tietz Fundamentals og Clinical Chemistry: Establishment and use of referance values*. Saunders Elsevier.2008. s. 251-260
  29. Referanseområde. MedTekipedia. (Elektronisk artikkel) ukjent årstall.(Hentet 2016.04.13.). Tilgjengelig fra:  
<https://medtekipedia.wikispaces.com/Referanseomr%C3%A5de>
  30. Figenschou M. *Validering og anvendelse av ELISA-metode for å måle myeloperoksidase i plasma*.( Masteroppgave). Stavanger. Universitet i Stavanger; 2012. 82 sider. (Hentet 2016.04.17). Tilgjengelig



fra:<https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/182513/Figenschou,%20Mette.pdf?sequence=1>

31. Palme R., Touma Ch., Lepschy M., Dominchin F., Arias N. *Steroid extraction: Get the best out of faecal samples*; ResearchGate;(Elektronisk artikkel). 2013.09. (Hentet 2016.02.12) Tilgjengelig fra :  
[https://www.researchgate.net/publication/256712805\\_Steroid\\_extraction\\_Get\\_the\\_best\\_out\\_of\\_faecal\\_samples](https://www.researchgate.net/publication/256712805_Steroid_extraction_Get_the_best_out_of_faecal_samples)
32. Yin Y.J, Nie C.Y, Liu W.S, Zou Q, Zhai J.C, Han H.S. et al. *Non-invasive determination of the immune physiological state of reindeer (*Rangifer tarandus*) in the Greater Khingan Mountains, China*, Pub.Med Journals database (Elektronisk artikkel). 2015.08.(Hentet 2016-01-28.) 9 sider. Tilgjengelig fra:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125874>
33. Shuai HUANG, Lian LI, Jie WU, Chengmin LI, Jingyan BAI, Yu SUN, et al. *Seasonal variations in immunoreactive cortisol and fecal immunoglobulin levels in Sichuan golden monkey (*Rhinopithecus roxellana*)* Nanjing, P.R. China College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University; 13.08.2014;(Hentet 2016-01-25) 650 sider; Tilgjengelig fra:  
[online.journals.tubitak.gov.tr](http://online.journals.tubitak.gov.tr)
34. Dawn Pauling C. *Surveying internal parasites and fecal cortisol in captive scimitar-horned oryx, *oryx dammah*, between environments*. 2014.12.(Hentet 2016-01-29); 79 sider, Tilgjengelig fra  
<https://central.space.ucmo.edu/handle/123456789/383>
35. Neogen corporation. *Cortisol ELISA Kit Instructions*. USA/Canada. 2014. D402710-8/22/14. 7 sider.

### **Vedlegg 1: Prosedyre for gjenfinning metode og kortisol ekstraksjon:**

- Tinte opp 4 feces prøvene.
- Ristet prøvene godt for å få blandet innholdet i prøvene.
- Pipettert 1 ml av hver prøve i hver sitt steril glassbeholder.
- Laget 3 paralleller av hver prøve.
- Tilsatte 10 $\mu$ l kortisol i parallell N1 i hver prøve.
- Satt beholdere i varmeovn på 80°C til 24 timer.
- Overført 0,1g av hver tørket prøve til et nyt rør og tilsatt 1 ml 80% EtOH.
- Ristet rørene godt i 30min.
- Tilsatte til alle paralleller N2 10 $\mu$ l kortisol.
- Sentrifugert rørene ved 5000rpm i 15 min.
- Tatt ut supernatantene i hver sitt nyt rør.
- Fordampet løsningene til tørrhet i en vakuum container.
- Oppløste ekstraherte prøvene med 100 $\mu$ l 80%EtOH.
- Laget til Assay buffer: tilsatt 4ml.destillert vann til 1ml. Assay Buffer.
- Tilsatte 1000 $\mu$ l tillaget Assay ekstraksjon buffer.
- Ristet prøvene godt i vortex, inkuberte dem i 5 min ved rom temperatur.
- Ristet prøvene igjen og lot det stå i 5 min. til ved rom temperatur.
- Analyserte prøvene med ELISA metode.

### **Vedlegg 2: Prosedyre for kortisolanalyse med ELISA.**

- Tatt opp kortisolprøvene fra fryseren og tint i kjøleskap.
- Brukte ELISA- kit Lot 0152,der alle reagenser følger med. Plate Lot:150706  
Expiration date:06.07.17
- Bestemte antall brønner som skal brukes og forberedte registreringskjema (vedlegg 3)
- Forberedte standarder:  
Standard A -stock solution 1 $\mu$ g/ml;  
Standard B - tok 20 $\mu$ L av standard A, tilsatte 980 $\mu$ L av EIA buffer og blandet;  
Standard C- tok 200 $\mu$ L av standard B, tilsatte 1,8 mL av EIA buffer og blandet;  
Standard D- tok 200 $\mu$ L av standard C, tilsatte 1,8mL av EIA buffer og blandet;
- Blandet standarder i følge skjema 1: (Tabell 2)

Tabell 2.1: Skjema 1: Standard forberedelse:

Standarder	Konsentrasjon av kortisol ng/mL	EIA buffer $\mu$ L tilsatt	B standard, $\mu$ L	C Standard, $\mu$ L	D standard, $\mu$ L
S(0)	0	as is	-	-	-
S(1)	0,04	800	-	-	200
S(2)	0,1	500	-	-	500
S(3)	0,2	-	-	-	as is
S(4)	0,4	800	-	200	-
S(5)	1	500	-	500	-
S(6)	2	-	-	as is	-
S(7)	10	500	500	-	-
S(8)	20	-	as is	-	-

- Fortynnet kortisol enzymkonjugat. Tilsatt 110  $\mu$ L av enzymkonjugatet til 5,5mL EIA buffer og blandet godt.
- Tilsatte 50 $\mu$ L av standardene og 50 $\mu$ L av ukjente prøvene til bestemte brønnene på platen. Laget 2 paralleller. Registrerte i skjema (vedlegg 1)
- Tilsatte 50 $\mu$ L av fortynnet enzymkonjugat til hver brønn ved bruk av multikanal pipette for hurtig tilsetning.
- Blandet ved å riste forsiktig.
- Dekket med plastfilm og inkuberte ved romtemperatur i 1 time.
- Fortynnet vaskebuffer med destillert vann: Tatt 20 mL av vaskebuffer og tilsatt 180 mL destillert vann og blandet grundig.
- Dumpet ut innholdet av platen etter inkuberingen.
- Vasket brønnene tre ganger med 300 $\mu$ L av den fortynnede vaskebuffer.
- Tilsatte 150  $\mu$ L av substrat til hver brønn ved bruk av multikanalpipette. Blandet forsiktig.
- Inkuberte ved romtemperatur i 30 minutter.
- Tilsatte 100  $\mu$ L av stoppløsning 1 M HCl til hver brønn og lot det stå og virke i 10 minutter.

- Ristet plate før avlesning for å sikre jevn farge gjennom hver brønn.
- Leste av absorbanverdiene ved hjelp av Synenergy/HTX multi-mode reader ved 450nm bølgelengde.

**Vedlegg 3: Registreringsskjema. Kortisol ELISA-kit.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												