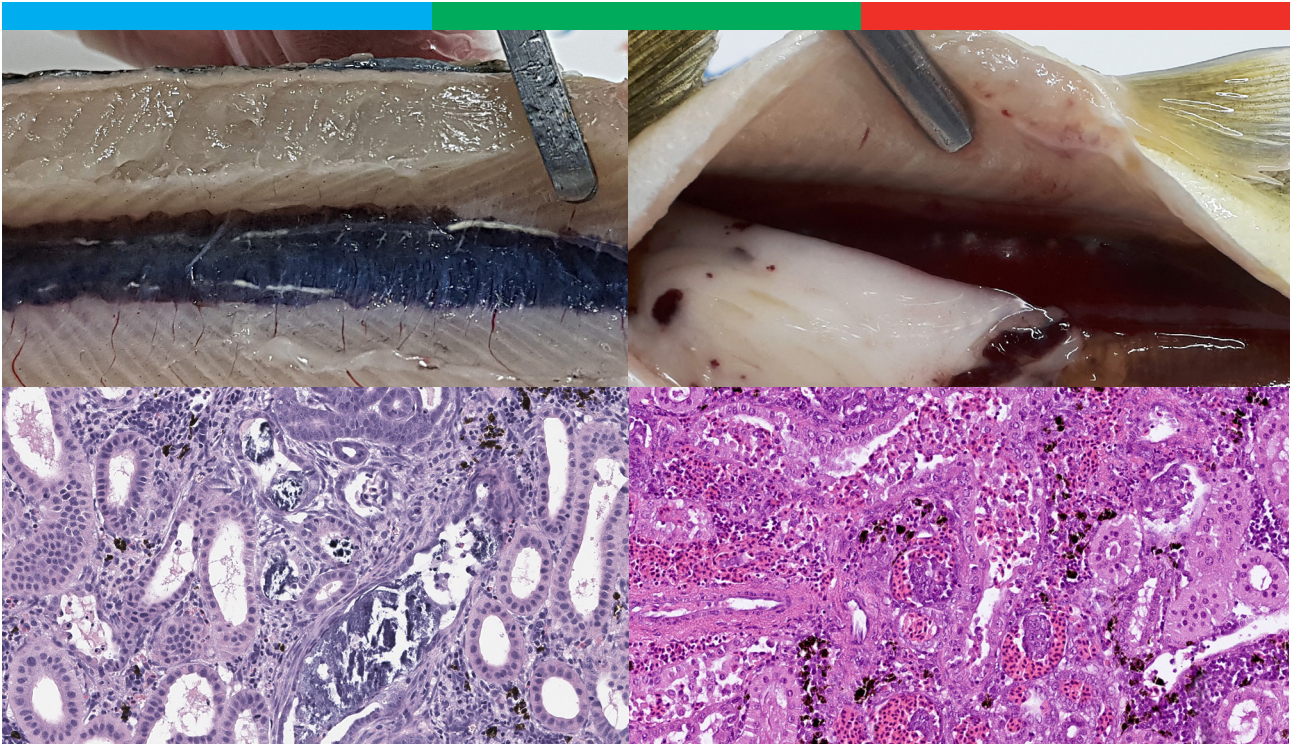




# Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom: Årsakssammenhenger og muligheter for forebygging, (STONEHUNT). Sluttrapport FHF prosjekt 901588





**Veterinærinstituttet**  
Norwegian Veterinary Institute

Postboks 64, 1431 Ås

---

Rapportserienummer Veterinærinstituttet

VI-rapport 6/2024

ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)

**Tittel:**

Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom: Årsakssammenhenger og muligheter for forebygging, (STONEHUNT). Sluttrapport FHF prosjekt 901588

**Forfattere:**

Arve Nilsen<sup>2</sup>, Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>, Camilla Diesen Hosfeld<sup>1</sup>, Anne Berit Olsen<sup>2</sup>, Kai-Inge Lie<sup>4</sup>, Marianne Kraugerud<sup>4</sup>, Per Gunnar Fjellidal<sup>3</sup>, Ingunn Sommerset<sup>2</sup>, Ian Mayer<sup>5</sup> og Sofie Charlotte Remø<sup>3</sup>

1: Høgskulen på Vestlandet, Inndalsveien 28, 5063 Bergen

2: Veterinærinstituttet, Postboks 64, 1431 Ås

3: Havforskningsinstituttet, Postboks 1870, Nordnes, 5817 Bergen

4: Pharmaq Analytiq AS, Harbitzalléen 2A, 2A, 0275 Oslo

5: Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU), Postboks 5003 1433, Ås

Forfattere er også kreditert på hvert delkapittel.

**Prosjektleder:**

Arve Nilsen ([arve.nilsen@vetinst.no](mailto:arve.nilsen@vetinst.no))

**Publisert:**

07.03.2024

**Forslag til sitering:**

Nilsen, A., Fivelstad, S., Hosfeld, C.D., Olsen, A.B., Lie, K.I., Kraugerud, M., Fjellidal, P.G., Sommerset, I., Mayer, I., Remø, S.C. (2024). Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom: Årsakssammenhenger og muligheter for forebygging. Sluttrapport FHF prosjekt 901588, Veterinærinstituttets rapportserie 6/2024, 78 pp.

**Forsidebilde:**

Øverst til venstre: Nefrokalsinose med utfellinger i nyrets utførselsganger (Anne Berit Olsen, Veterinærinstituttet). Nederst til venstre: Histologibilde av nyre fra fisk med nefrokalsinose (Kai-Inge Lie, Pharmaq Analytiq). Øverst til høyre: Obduksjonsfunn med typiske funn for hemorragisk smoltsyndrom (Anne Berit Olsen, Veterinærinstituttet). Nederst til høyre: Histologibilde av nyre fra fisk med hemorragisk smoltsyndrom (Anne Berit Olsen, Veterinærinstituttet).



**Høgskulen  
på Vestlandet**



**PHARMAQ**  
Analytiq



**Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet**

# INNHold

---

Sammendrag .....	1
Summary .....	2
hovedfunn .....	3
<b>1 Bakgrunn .....</b>	<b>4</b>
1.1 Innledning .....	4
1.2 Målsettinger for prosjektet .....	5
1.3 Forventet nytteverdi .....	5
1.4 Gjennomføring .....	5
<b>2 Kartlegging i felt (AP1) .....</b>	<b>8</b>
2.1 Innledning .....	8
2.2 Metode .....	8
2.3 Resultat .....	10
2.4 Diskusjon .....	27
<b>3 Forsøk 1: Fysiologiske endringer hos atlantisk laks, fra fire oppdrettsanlegg, eksponert for moderat forhøyet CO<sub>2</sub>-nivå under smoltifisering .....</b>	<b>31</b>
3.1 Innledning .....	31
3.2 Metode .....	31
3.3 Resultat .....	34
3.4 Diskusjon .....	41
<b>4 Forsøk 2: Nefrokalsinose under smoltifisering hos atlantisk laks (<i>salmo salar</i>) eksponert for hyperkapni (høy CO<sub>2</sub>) og en kombinasjon av hyperkapni og hyperoksi (høy CO<sub>2</sub> og høy O<sub>2</sub>) .....</b>	<b>43</b>
4.1 Innledning .....	43
4.2 Metode .....	43
4.3 Resultat .....	45
4.4 Diskusjon .....	54
<b>5 Hemorragisk smoltsyndrom (HSS) .....</b>	<b>56</b>
5.1 Innledning .....	56
5.2 Metode .....	56
5.3 Resultat .....	56
5.4 Diskusjon .....	63
5.5 Hemorragisk smoltsyndrom og nefrokalsinose .....	64
<b>6. Metabolske og fysiologiske forandringer .....</b>	<b>66</b>
6.1 Innledning .....	66
6.2 Metode .....	67
6.3 Resultat .....	68
6.4 Diskusjon .....	75
<b>7 Leveranser i prosjektet .....</b>	<b>79</b>
<b>8 Referanser .....</b>	<b>80</b>
<b>9 Vedlegg .....</b>	<b>86</b>

## SAMMENDRAG

---

Sykdommene nefrokalsinose (NK) og hemorragisk smoltsyndrom (HSS) er vurdert som to av de viktigste helseutfordringene ved produksjon av settefisk (Atlantisk laks). Nefrokalsinose blir påvist både hos laks og regnbueørret. NK karakteriseres av mineralholdige utfellinger i nyrets ekskresjonssystem, der urinen dannes. Utførselsgangene blir skadet og tilstoppet og etter hvert blir også interstitielt bloddannende vev i nyret påvirket. HSS rammer laks gjerne i rent ferskvann før og under smoltifisering og påvises i tidlig fase som blødninger til nyretubuli, men etter hvert oppstår omfattende blødninger i muskulatur og indre organer.

For NK er det i en rekke forsøk vist at fysiologiske endringer i fisken og mineralutfellinger kan oppstå som følge av forhøyede verdier av CO<sub>2</sub> i vannet, med en antatt grenseverdi for utvikling av nyreskader rundt 15 mg/L. Betydningen av andre forhold, som tidligere livshistorie, vanntemperatur, salinitet og andre vannkvalitetsparametere har vært mer usikker. For HSS har vi ikke hatt noen sikre hypoteser om årsaksforhold, utover at det ikke ser ut til å skyldes et smittomt agens. Nefrokalsinose og HSS kan oppstå samtidig og begge tilstandene kan føre til økt dødelighet, men som regel med rask helbredelse etter at fisken kommer ut i sjøvann. Det har vært spekulert i at HSS med blødning til tubuli kan utgjøre en risikofaktor for utfelling av mineralsteiner og dermed være en forløper til NK.

I dette prosjektet ble det kartlagt forekomst av NK og HSS i seks kommersielle settefiskanlegg, og samtidig gjennomført måling av blodverdier og undersøkelse av vannkvaliteten i anleggene. I to laboratorieforsøk ble laks eksponert for økt nivå av CO<sub>2</sub> i tida under smoltifisering og fisken ble fulgt i ca. 50 dager etter overføring til sjøvann. Frem til oppstart av forsøket ble fisken holdt ved lysregime LD 12:12 (vintersignal), før det ble justert til fullt lys (LD 24:0) ved oppstart. I forsøk 1 ble det undersøkt effekten av moderat CO<sub>2</sub>-belastning (16 mg/L) i ferskvann med 9 °C og salinitet fra 1 til 7 promille. Settefisk fra tre kommersielle anlegg ble brukt sammen med fisk fra forsøksstasjonen på Matre for å undersøke om tidligere livshistorie kunne ha innflytelse på fiskens respons på CO<sub>2</sub>-belastningen. I forsøk 2 ble det brukt ferskvann med en temperatur på 5 °C. Her ble CO<sub>2</sub>-nivået økt til 23 mg/L og det var i tillegg en testgruppe der CO<sub>2</sub>-belastning ble kombinert med en moderat hyperoksi (125 % DO). I begge forsøk var det kontrollgrupper som ble eksponert for lav CO<sub>2</sub> (2 – 3 mg/L).

Fysiologiske og histopatologiske funn var i overensstemmelse med tidligere beskrivelser av NK og HSS, og det var et godt samsvar mellom funn i forsøkene og det som ble påvist i prøvematerialet fra kommersielle settefiskanlegg. I prøver fra settefiskanlegg var prevalens av NK på 35,8 % og prevalens av HSS på 10,7 %, mens vannkvalitetsmålinger stort sett viste moderat belastning og verdier av CO<sub>2</sub> under 15 mg/L. I de kontrollerte forsøkene ble forekomst av fisk med NK tydelig redusert etter at fisken ble flyttet til kar med lav belastning av CO<sub>2</sub>. Det samme skjedde med både HSS og NK etter overføring til sjøvann, og det skjedde både i forsøk og i de kommersielle anleggene. I forsøk og feltmateriale fant vi mange fisk som hadde HSS og NK samtidig, men i tidsserier fra ulike kar eller anlegg ble NK i hovedsak påvist tidligere enn HSS. HSS så ikke ut til å være en forløper for NK. Det så ut til at tilstandene forekom parallelt, og at de til en viss grad kunne utløses av de samme miljøbelastningene. NK og HSS så ut til å gi ulike fysiologiske endringer i fisken og bør anses som to ulike sykdomstilstander. Bruk av smoltprotokoll med lysstyring kan se ut til å påvirke forekomsten av NK.

I begge forsøkene førte belastning med CO<sub>2</sub> under smoltifiseringen til fysiologiske endringer i smolten. Økt nivå av CO<sub>2</sub> i plasma førte umiddelbart til redusert pH i blodet. Dette ble kompensert ved at fisken tok opp HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fra vannet i bytte med Cl<sup>-</sup>, pH i blodet steg, mens plasma Cl<sup>-</sup> gikk ned. Ved moderat CO<sub>2</sub>-belastning i forsøk 1 (16 mg/L) ble det ikke påvist utvikling av verken NK eller HSS og det var små og forbigående utslag på hematokrit og plasmaverdier som Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, selv om det så ut til å være tydelige forskjeller i fysiologisk respons mellom de ulike fiskegruppene. Ved høy CO<sub>2</sub>-belastning i forsøk 2 (23 mg/L) ble det funnet en tydelig økning i forekomst av NK og i et av replikatene med kombinert CO<sub>2</sub>- og O<sub>2</sub>-belastning var det en markert økning i forekomst av HSS, også med dødelighet. Her registrerte vi en tydelig sammenheng mellom NK og økt plasma Ca<sup>2+</sup>, en effekt som så ut til å bli påvirket av avlivingsmetoden. Fisk med økende grad av NK hadde økt Ca/P-ratio i nyrevevet, et forhold som ikke ble påvirket av avlivingsmetoden. Hos fisk som ble eksponert for CO<sub>2</sub>-verdier på 23 mg/L var det også redusert tilvekst, akkumulering av kalsium i nyre og indikasjoner på økt mineralisering av ryggvirvler.

## SUMMARY

---

The diseases nephrocalcinosis (NC) and hemorrhagic smolt syndrome (HSS) are ranked as two of the most significant health challenges in the production of fry (Atlantic salmon). Nephrocalcinosis is detected in both salmon and rainbow trout and is characterized by mineral deposits in the kidney's excretory system, where urine is formed. The ducts become damaged and blocked, eventually affecting the interstitial blood-forming tissue in the kidney. HSS typically affects salmon in freshwater before and during smoltification, it is detected in the early phase as bleeding into the renal tubules, but extensive bleeding in muscles and internal organs occurs over time. For NC, several studies have shown physiological changes in fish and mineral deposits due to elevated levels of CO<sub>2</sub> in the water, with an estimated threshold value for the development of kidney damage around 15 mg/L. The significance of other factors, such as early life history, water temperature, salinity, and other water quality parameters, has been more uncertain. For HSS, there has not been identified any probable causes, other than the absence of an infectious etiology. NC and HSS can occur simultaneously, and both conditions can lead to increased mortality, usually with rapid recovery after sea transfer. It has been hypothesized that HSS with bleeding into tubules may be a risk factor for the precipitation of mineral stones and thus be a precursor to NC.

In this project, the prevalence of NC and HSS was surveyed in six commercial fry facilities, and simultaneous measurements of blood values and examination of water quality were conducted in the facilities. In two laboratory experiments, salmon parr were exposed to increased levels of CO<sub>2</sub> during smoltification, and the fish were monitored for about 50 days after transfer to seawater. Prior to the experiment, the fish were exposed to a 12:12 photoperiod (winter), adjusting this to full light (24:0) at the onset of the trial. In Experiment 1, the effect of moderate CO<sub>2</sub> loading (16 mg/L) in freshwater with a temperature of 9°C and salinity from 1 to 7 parts per thousand was examined. Fry from three commercial facilities were used along with fish from the Matre research station to investigate whether early life history could influence the fish's response to CO<sub>2</sub> loading. In Experiment 2, freshwater with a temperature of 5°C was used. Here, the CO<sub>2</sub> level was increased to 23 mg/L, and there was an additional test group where CO<sub>2</sub> loading was combined with moderate hyperoxia (125% DO). In both experiments, comparative control groups exposed to low CO<sub>2</sub>-levels (2-3 mg/L) were included.

Physiological and histopathological findings were in line with previous descriptions of NC and HSS, and there was good correlation between the findings in the experiments and those found in the samples from commercial hatcheries. In samples from hatcheries, the prevalence of NC was 35.8%, the prevalence of HSS was 10.7%, while water quality measurements mostly showed moderate loading and CO<sub>2</sub> values below 15 mg/L. In controlled experiments, the occurrence of fish with NC was significantly reduced after the fish were moved to tanks with low CO<sub>2</sub> loading. The same occurred with both HSS and NC after transfer to seawater, both in experiments and in commercial facilities. In experiments and field materials, we found many fish displaying signs of HSS and NC simultaneously, but in time series from different tanks or facilities, NC was mainly detected earlier than HSS. Thus, HSS did not seem to be a precursor to NC. It appeared that the conditions occurred in parallel, to some extent triggered by the same environmental stresses. NC and HSS seemed to cause different physiological changes in the fish and should be considered as two distinct disease conditions. The prevalence of NC is possibly influenced by the use of a photoperiod to induce parr-smolt transformation.

In both experiments, CO<sub>2</sub> exposure during smoltification induced an immediate increase in CO<sub>2</sub> levels in plasma with a subsequent reduction of blood pH. This was compensated by uptake of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> from the water in exchange for Cl<sup>-</sup>, thus blood pH increased and plasma Cl<sup>-</sup> decreased. With moderate CO<sub>2</sub> exposure in Experiment 1 (16 mg/L), there was no development of neither NC nor HSS, and there were small and transient effects on haematocrit and plasma values such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, although there appeared to be clear differences in physiological response between the different fish groups. With high CO<sub>2</sub> exposure in Experiment 2 (23 mg/L), a clear increase in the incidence of NC was observed, and in one of the replicates with combined exposure of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>, also a marked increase in the incidence of HSS, including mortality. There was a correlation between NC and increased plasma Ca<sup>2+</sup>, however, the effect seemed to be influenced by the euthanasia method. Fish with an increasing degree of NC showed an increased Ca/P ratio in kidney tissue, a ratio unaffected by the euthanasia method. In fish exposed to CO<sub>2</sub> values of 23 mg/L, there was also reduced growth, accumulation of calcium in the kidney and signs of increased mineralization of the vertebra.

## HOVEDFUNN

---

- I en kartlegging av nefrokalsinose (NK) og hemorragisk smoltsyndrom (HSS) i seks kommersielle settefiskanlegg fra oktober 2019 til august 2021 ble begge sykdommene påvist i alle anleggene. Histologisk undersøkelse viste en prevalens av NK på 35,8 %, med variasjon mellom anlegg fra 8,3 til 64,3 %. For HSS var prevalens 10,7 %, med variasjon fra 1,4 til 22,5 %.
- Både NK og HSS hadde høyest prevalens og alvorlighetsgrad på siste uttak før sjøsetting, med gjennomsnittlig 60,7 % prevalens av NK og 25,2 % prevalens av HSS.
- NK og HSS framsto som to ulike sykdomstilstander som til en viss grad forekom parallelt, og som kan ha delvis overlappende årsaksfaktorer. Det ble ikke funnet bevis for at HSS er en forløper for utvikling av mineralutfellinger og NK.
- Jevnlig uttak av nyreprøver for histopatologi kan gi et godt grunnlag for tidlig oppdaging og kvantifisering av forekomsten av både NK og HSS.
- I kontrollerte forsøk med laks under smoltifisering ble det funnet en klar sammenheng mellom eksponering for høye nivåer av CO<sub>2</sub> og utvikling av NK. Ved eksponering for CO<sub>2</sub> på 16 mg/L (9 °C, 1–7 promille salt) ble det påvist moderate fysiologiske endringer i fisken, men ikke påvist NK. Eksponering for 23 mg/L (5 °C, 0 promille salt) i forsøk 2 ga derimot en rask utvikling av NK.
- I forsøk 1 ble det påvist NK hos parr som ble tatt inn til forsøket fra flere kommersielle settefiskanlegg. Hos forsøksfisken ble forekomsten av NK raskt redusert, mens i samme fiskegruppe som sto igjen i settefiskanleggene ble det påvist en markert øking av NK i tida fram til sjøsetting. I forsøk 2 hadde fisken 25 % prevalens av NK før inntak og akklimatisering i laboratoriet, og 16,5 % ved start av forsøket. I fisken som ble eksponert for høy CO<sub>2</sub> steg prevalensen av NK raskt, mens NK var forsvunnet i kontrollfisken etter 37 dager. Forekomsten av NK ble raskt redusert etter overføring til ferskvann eller til sjøvann med lave nivå av CO<sub>2</sub>.
- I forsøk 2 var det økt akkumulering av kalsium i nyre og indikasjon på økt mineralisering av ryggvirvlene hos fisk eksponert for CO<sub>2</sub> sammenlignet med kontrollfisken. Det ble også påvist økt ratio av Ca/P i nyrevevet med økende grad av NK.
- I grupper som ble eksponert for CO<sub>2</sub> (både 16 og 23 mg/L) var det økt PCO<sub>2</sub> i blod, økt nivå av plasma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, økt plasma pH og redusert nivå av plasma klorid.
- Bruk av bedøvelse ved blodprøvetaking kan ha stor innflytelse på plasmaverdier og bør tas i betraktning ved planlegging, gjennomføring og tolking av resultater.
- Nyreutfellinger fra både feltmateriale og forsøk besto av fosfatsteiner, der kalsium- og karbonatholdig Dahlitt dominerte. Magnesiumforbindelser (struvitt) ble også påvist.
- I forsøk 2 ble HSS påvist i alle forsøksgruppene, men med et markert utbrudd i ett av karene der fisken ble eksponert for 23 mg/L CO<sub>2</sub> og 123 % DO.
- Fisk med HSS hadde lavere hematokrit enn fisk uten påvist HSS, dette gjaldt både i forsøk og i feltundersøkelsen.
- Fisk med HSS hadde signifikant høyere vekt enn fisk uten påvist HSS i samme gruppe, dette gjaldt både i forsøk og i feltundersøkelsen. Variasjoner i smoltifiseringsprosessen (hormonstatus og aktivitet av gjelle ATP-ase) så ut til å være assosiert med utviklingen av HSS.
- Utviklingen av HSS økte i ferskvannsperioden og stoppet ved overgangen til sjøvann.
- Årsaken til utvikling av HSS er fortsatt uavklart. I prosjektet ble det ikke påvist noen infeksiøs årsak.
- Flere forsøk bør gjøres for å videreutvikle en reproducerbar laboratoriemodell for HSS.

# 1 BAKGRUNN

---

Av: Arve Nilsen<sup>2</sup>, Ingunn Sommerset<sup>2</sup>, Camilla Diesen Hosfeld<sup>1</sup>, Sofie Charlotte Remø<sup>3</sup>, Kai-Inge Lie<sup>4</sup>, Marianne Kraugerud<sup>4</sup>, Ian Mayer<sup>5</sup>, Lise Bjørkhaug Gundersen<sup>1</sup>, Mona Gjessing<sup>2</sup>, Per Gunnar Fjellidal<sup>3</sup>, Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>

## 1.1 INNLEDNING

Produksjon av settefisk har blitt mer intensivert de siste årene og flere produsenter har opplevd utfordringer med "gamle problemer" som nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom. Dette er diagnoser som har vært kjent fra oppdrettslaks i lang tid, men den medisinske og fysiologiske forståelsen av tilstandene er mangelfull.

Nefrokalsinose (heretter forkortet NK) kjennetegnes makroskopisk med at det i nyrene er lyse utfellinger som varierer fra myke til harde – dvs nyrestein når det myke materialet har blitt mineralisert. Histologisk finner vi utfellingene i urinveiene (Smart et al. 1979) og i uttalte tilfelle ødelegges nyrene totalt. Langvarig høyt nivå av CO<sub>2</sub> er en kjent risikofaktor og selv om det er rapportert at NK finnes i anlegg med antatt normale eller lave CO<sub>2</sub> nivå (under 15 mg/L), er trolig målemetodene ikke nøyaktige nok (pers. med. S. Fivelstad). Høgskolen på Vestlandet (HVL) og Veterinærinstituttet (VI) har gjort flere forsøk for å eksperimentelt reprodusere NK ved (1) høyt innhold av karbonat i vannet (Fivelstad et al. 1999 og 2003b), (2) ved lav temperatur (Fivelstad et al. 1999) og (3) ved lav alkalitet (Fivelstad et al. 2003a). Ved gjennomgang av arbeidet og erfaringer gjort i tidsrommet 1994-2018 viser det seg at i alle forsøkene der NK blir påvist, kommer fisken opprinnelig fra anlegg med intensiv drift, altså anlegg med høyt nivå av CO<sub>2</sub> og forekomsten synes uavhengig av andre forhold.

Hemorragisk smoltsyndrom (HSS) eller hemorragisk diatese (HD) rammer også laks i settefiskfasen (Rodger og Richards 1998), gjerne i rent ferskvann før og under smoltifisering. Det er vanlig å finne mange småblødninger i ulike organer, inkludert til nyrets urinveier. De mange småblødningene gjør at HSS likner fryktede virussykdommer som infeksjøs lakseanemi (ILA), viral hemorragisk septikemi (VHS) og infeksjøs hemorragisk nekrose (IHN). HSS går typisk over etter sjøsetting og det har vært mistenkt at en fysiologisk ubalanse gjør at blodkarene «lekker» blodlegemer (diatese). NK og HSS betraktes som to separate tilstander, men det er observasjoner fra felt som indikerer at HSS opptrer i forkant av NK, og Fivelstad et al. (1999) har også påvist NK samtidig med HSS. Når HSS og NK sees samtidig, er det en mulighet at HSS først gir lekkasje av blod til urinveiene og at NK utvikles sekundært fordi kalk feller ut i ødelagte blodlegemer (upublisert, VI og Fish Vet Group). Men det kan også være omvendt, at begynnende mineral-krystaller gir aggregering av makromolekyl og en «ond sirkel» med mer og mer krystallisering, skader og blødninger. Ved kronisk uttalt NK sees ofte en omfattende betennelse som utviser nyrens bloddannende vev (upublisert, VI og FVG). Dette vevet står for fiskens produksjon av røde og hvite blodlegemer. En mulig konsekvens av uttalt betennelse i nyre som følge av NK kan også være nedsatt immunforsvar og nedsatt produksjon av røde blodceller.

Det er viktig å få mer presis kunnskap om årsaker og effekter slik at riktige tiltak kan settes inn. Flere publikasjoner viser en korrelasjon mellom langvarig høye CO<sub>2</sub>-nivå og utvikling av NK hos laks. Likevel må flere faktorer spille inn da høyt CO<sub>2</sub> alene ikke ser ut til å være nok, og NK også ser ut til å opptre uten samtidig CO<sub>2</sub>-belastning. I studier av årsaks-sammenhenger og mekanismer er laboriemodeller for NK og HSS viktig. Samtidig kan ikke resultater fra kontrollerte forsøk frikobles fra realitetene i felt. Med økt kunnskap om hvilke faktorer eller kombinasjoner av faktorer som leder

til NK og HSS og en mer målrettet diagnostikk, kan næringen i større grad unngå eller forebygge utviklingen på et tidlig stadium.

## 1.2 MÅLSETTINGER FOR PROSJEKTET

### Hovedmål

Å karakterisere NK og HSS-tilstandene og definere hvilke kombinasjoner av faktorer i miljø og fiskens biologi som kan knyttes til utvikling av sykdommene.

### Delmål

Med utgangspunkt i at langvarig forhøyet CO<sub>2</sub> er en kjent risikofaktor – undersøke hvilke tilleggsfaktorer som kan påvirke forekomsten ved å:

- Kartlegge og analysere miljø og fisk i longitudinelle studier i risikoanlegg i felt, og korrelere disse faktorene til forekomst og alvorlighetsgrad av tilstandene.
- Teste hypotesen om at det skjer fysiologiske forandringer i nyrene under langvarig eksponering for intensiv drift som fører til at smolten er mer utsatt for å få NK enn smolt under ikke-intensiv drift.
- Teste hypotesen om at HSS øker sannsynligheten for NK ved at lekkasje av blodceller eller plasmaprotein danner kimen til mineralisering og utfelling i nyretubuli.
- Karakterisere morfologisk og kategorisere NK og HSS fremprovosert under ulike miljøforhold i kontrollert forsøk versus felt.
- Etablere en laboratoriemodell for HSS og rette fokus mot blodet, blodbanene og hormoner, for å se etter en forklaring som setter oss på sporet av mekanismene som utløser HSS.
- Øke kunnskapen om endringer i nyrefunksjon knyttet til osmoregulering.
- Beskrive metabolske og fysiologiske forandringer i fisken med og uten NK og HSS, med fokus på mineralomsetning, oksidativt stress, bufferkapasitet og velferd.

## 1.3 FORVENTET NYTTEVERDI

Prosjektet er viktig for å kunne redusere antall tilfeller og alvorlighetsgraden av NK og HSS, ettersom begge tilstandene gir økende velferds- og tapsproblemer i dagens settefiskproduksjon. Flere publikasjoner viser en klar sammenheng mellom langvarig høye CO<sub>2</sub> nivå og utvikling av NK, samtidig som flere faktorer må spille inn da høy CO<sub>2</sub> alene ikke ser ut til å være nok (Mota et al. 2019, Good et al. 2018). Det var overraskende lite forskning publisert på de to sykdommene da prosjektet startet. Med økt kunnskap om hvilke faktorer eller kombinasjoner av faktorer som leder til NK og HSS og en mer målrettet diagnostikk, kan næringen i større grad unngå eller forebygge utvikling med målrettede tiltak på et tidlig stadium.

## 1.4 GJENNOMFØRING

Prosjektet var inndelt i fire arbeidspakker (AP), med ansvar fordelt mellom prosjektpartnerne (Tabell 1.1.). Veterinærinstituttet hadde ansvaret for prosjektledelse.



Tabell 1.1. Arbeidspakker og prosjektorganisering.

Arbeidspakke	Hovedansvar	Kontaktperson
Prosjektledelse	Veterinærinstituttet	Arve Nilsen Ingunn Sommerset
AP1: Prøveuttak i felt	Veterinærinstituttet	Arve Nilsen Ingunn Sommerset
	Pharmaq Analytic (Fish Vet Group)	Marianne Kraugerud Kai-Inge Lie
	Høgskulen på Vestlandet	Sveinung Fivelstad Thea Vikingstad Sindre Rommetveit Fivelstad
AP2: Eksperimentelle studier	Høgskulen på Vestlandet	Sveinung Fivelstad* Camilla Diesen Hofsfeld
	Havforskningsinstituttet	Sofie Charlotte Remø
	Veterinærinstituttet	Ingunn Sommerset Anne Berit Olsen
AP3: Analyser fra AP1 og AP2	Høgskulen på Vestlandet	Sveinung Fivelstad
	Havforskningsinstituttet	Sofie Charlotte Remø Per Gunnar Fjellidal Erik Jiro Barman Michelsen
	Veterinærinstituttet	Anne Berit Olsen
	PHARMAQ Analytiq (Fish Vet Group)	Kai-Inge Lie Marianne Kraugerud
	NMBU	Ian Mayer
AP4: Sammenstilling av data og publisering	Høgskulen på Vestlandet	Sveinung Fivelstad Camilla Diesen Hofsfeld
	Veterinærinstituttet	Anne Berit Olsen Arve Nilsen Ingunn Sommerset
	Havforskningsinstituttet	Sofie Charlotte Remø

\*: Forsøksansvarlig FOTS (forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem)

### AP 1: Risikobasert prøveuttak fra felt – tidsserier

*Ansvar: Veterinærinstituttet (VI) og Fish Vet Group (FVG) (som i mars 2021 ble overtatt av PHARMAQ Analytiq AS)*

Basert på et utvalg av settefiskanlegg med en kjent historikk (risiko) for NK og/eller HSS, samt et kontrollanlegg (uten historikk på NK/HSS), skulle det utføres tre prøveuttak før sjøutsett (parr, pre-smolt, smolt), samt at utsatte grupper skulle følges opp i med en serie prøveuttak i sjø. Primært skulle det brukes histopatologiske forandringer i nyre for å følge utviklingen av NK og HSS, men det skulle også tas prøver for å kartlegge morfologiske, fysiologiske og biokjemiske mekanismer og forløp under ulike feltforhold.

### AP 2: Eksperimentelle studier

*Ansvar: Høgskolen på Vestlandet (HVL), Havforskningsinstituttet (HI) og Veterinærinstituttet (VI)*

Her var det planlagt to forsøk: Ett forsøk der pre-smolt fra intensive og ikke-intensive anlegg skulle utsettes for høy og lav CO<sub>2</sub>, og ett forsøk der vi skulle prøve å etablere en laboratoriemodell for HSS. Som for AP1, var det primært histopatologiske forandringer i nyre som skulle brukes for å følge utviklingen av NK og HSS, i tillegg til uttak av prøver for morfologiske, fysiologiske og biokjemiske analyser som kan bidra til å kartlegge mekanismer og forløp under kontrollerte forhold.

### **AP 3: Analyser av prøver fra AP1 og AP2**

*Ansvar: HVL, VI, HI, FVG/PHARMAQ Analytiq AS og Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU)*

Her inngikk morfologiske analyser med utarbeidelse av et felles scoringssystem for histopatologiske forandringer karakteristisk for NK og HSS. Blodprøver fra sekvensielle uttak skulle analyseres for å lete etter markører for NK og HSS (klinisk kjemi) og hormoner knyttet til smoltifisering og kalsiumhomeostase, blodelektrolytter, hematologiske parametere samt markører for oksidativt stress skulle også bli analysert.

### **AP 4: Sammenstilling av data og publisering**

*Ansvar: HVL, HI og VI*

Datahåndtering, kvalitetssikring og prosessering for å kunne gjøre statistiske analyser og resultater tilgjengelige i form av populærvitenskapelige artikler og manus til fagfellevurderte artikler.

### **Formidlingsplan**

Prosjektet ble presentert i Norsk Fiskeoppdrett i løpet av våren 2020, og tidlige resultater på Frisk Fisk-konferansen 1. kvartal 2021, samt en oppfølgingsartikkel i Norsk Fiskeoppdrett 3. kvartal 2021. Resultatene skulle også presenteres på FHF-seminarer og ferdigstilling av manus til minst en vitenskapelig artikkel i internasjonalt tidsskrift planlegges ved planlagt prosjektslutt 4. kvartal 2022.

### **Endret tidsplan**

Den første utfordringen prosjektet støtte på våren 2020 var Covid 19 og nedstengningen av samfunnet på grunn av smittevern hensyn. Dette førte til flere vanskeligheter for gjennomføringen både av forsøk 1 på Matre og innhenting av prøvemateriell fra felt til AP1. For forsøk 1 ble det ikke mulig å gjennomføre den planlagte arbeidsfordelingen, slik at mye av ansvaret for oppfølging og uttak ble overført til Havforskningsinstituttet. For AP1 ble det vanskelig å gjøre prosjektreiser, noe som blant annet førte til at vi fikk gjort færre undersøkelser av vannprøver enn planlagt, se Kapittel 2. I løpet av prosjektperioden ble det gjort noen tilpasninger og endringer i planene for miljøeksponering og gruppeoppsett, se Kapittel 3 og 4. Planlagt prosjektavslutning var 31.12.2022, men ble etter avtale med FHF utsatt til 31.12.2023.

### **Takk til**

Vi ønsker å gi en spesiell takk til de anleggene som deltok i undersøkelsen, både for adgang til anleggene og for aktivt samarbeid med prøveuttak og datainnsamling. En særlig takk til Lønningdal og Benchmark AS for muligheten til å gjøre tidsserier med uttak av prøver fra både fisk og vann. En stor takk også til de private eller bedriftsinterne helsetjenestene som gjorde mye av feltjobben i AP1. I tillegg ønsker vi å takke Thea Vikingstad, Sindre Rommetveit Fivelstad og Kamilla Barstad (Høgskulen på Vestlandet), Merete Gåsvær Sture, Kari Sandnes, Henriette Kvalvik og Torill Thoreby Jensen (Veterinærinstituttet) Audun Østby Pedersen, Karen Anita Kvestad, Ivar Helge Matre, Maren Hoff Austgulen, Simon Flavell, Lise Dyrhovden (HI) og Markus Sjøstrand og Steffen H. Blindheim (ILAB) for uttak, registrering, preparering og analyser av prøvemateriale.

I løpet av prosjektperioden døde forsker Rune Waagbø fra Havforskningsinstituttet. Rune var en sentral bidragsyter til søknad og oppstart av prosjektet og han var en kunnskapsrik og populær kollega som er dypt savnet.

## 2 KARTLEGGING I FELT (AP1)

---

Av: Arve Nilsen<sup>2</sup>, Kai-Inge Lie<sup>4</sup>, Marianne Kraugerud<sup>4</sup>, Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>, Ingunn Sommerset<sup>2</sup> og Anne Berit Olsen<sup>2</sup>

### 2.1 INNLEDNING

Nefrokalsinose (NK) og hemorragisk smoltsyndrom (HSS) er over flere år blitt vurdert av fiskehelsepersonell som to av de aller viktigste helseproblemene i norsk settefisknæring, både for laks og regnbueørret (Fiskehelse rapporten 2019, 2020, 2021 og 2022). Siden dette ikke er meldepliktige sykdommer har vi begrenset kunnskap om utbredelsen og om hvordan dette utvikler seg i anleggene over tid. NK er, som omtalt i Kap.1, særlig knyttet til høye nivåer av CO<sub>2</sub>, men det blir også regnet med at andre faktorer knyttet til vannkvalitet og fysiologiske mekanismer i fisken spiller en viktig rolle. For HSS er årsaksforholdene mer uklare, og at NK og HSS ofte ser ut til å forekomme parallelt gjør det vanskelig å isolere risikofaktorer og å si noe sikkert om hvordan disse to tilstandene eventuelt påvirker hverandre under kommersielle driftsbetingelser. I prosjektet ble det derfor planlagt å følge fiskegrupper over tid for å se når NK og HSS lot seg påvise, hva som skjedde der begge tilstandene forekom samtidig og hvordan vevsforandringer og fysiologi ble påvirket ved utsett i sjø.

### 2.2 METODE

Hovedleveransen i denne delen var histopatologisk kartlegging av NK og HSS tatt som tidsserier i seks kommersielle anlegg (A – F), før og etter utsett i sjø og å koble disse funnene med individdata for størrelse og blodverdier. Det ble tatt ut 20 – 30 fisk pr uttak, og målet var å ta ut tre sett prøver i settefiskfasen, fra parr (20 – 40 g), pre-smolt (40 – 80 g) og smolt (80 – 200 g). Det skulle i tillegg tas prøver 1 og 2 måneder etter utsett, eventuelt også etter et halvt år i sjøen. For metodikk ved uttak av prøver, se Vedlegg 1. Opplysninger fra prøveuttakene var individuelle registreringer av vekt, lengde og ytre morfologi, i tillegg ble det ved noen av uttakene også gjort målinger av hematokrit (Hk) og undersøkt plasmaverdier for natrium, klorid, kalsium, fosfor og albumin.

Målsettingen med kartleggingen var ført og fremst å gi et best mulig bilde av den kliniske situasjonen i de undersøkte anleggene over tid. Alle data for makroskopisk vurdering, histopatologiske funn og analyser av blodparametere ble organisert på individnivå og overført til IBM SPSS Statistics for produksjon av samletabeller, figurer og for statistisk analyse. Valg av analyser beskrives i resultatdelen.

#### Histopatologi

Standard prøveuttak var nyrevev, hjerte og pseudobrank <sup>1</sup>. For nyre ble det tatt et tverrsnitt midt på kroppsnynet og et lengdesnitt av nyrets bakre halvdel. Snittene ble farget med standard hematoksilin og eosin-farging (HE). Et tilfeldig utvalg av preparater med tubulære utfellinger ble også farget med Von Kossa, en spesialfarging som gir mineralutfellinger en karakteristisk brun farge.

I tverrsnitt av nyre ble det talt opp antall tubuli og samlerør med basofilt krystallinsk materiale (tolket som mineralholdige utfellinger) og med forekomst av røde blodlegemer (tolket som blødning til urinveier). I tillegg ble det registrert forekomst av mineralutfellinger eller blødninger i nyrets interstitielle (bloddannende) vev (skåret som 0 eller 1). Påvisning av mineralholdige utfellinger i hjerte og pseudobrank ble også registrert (skåret som 0 eller 1).

---

<sup>1</sup> den første gjellebuen som sitter fast på innsida av gjellelokket

Fiskens skår for NK eller HSS ble bestemt ut fra samlet antall tubuli og samlerør med utfellinger eller blødninger i tverrsnittet av nyre og gjort om til en kategorisk variabel med 4 nivå: 0 (negativt)= ingen funn, 1 (svak) = 1 – 5 tubuli/samlerør, 2 (moderat) = 6 – 20 tubuli/samlerør, og 3 (kraftig) = over 20 tubuli/samlerør. Denne metoden er beskrevet av Anne Berit Olsen (Fivelstat et al. 2018), der ble det også brukt en kategori 4 (over 40 affiserte utførsels ganger), men i vårt materiale var det få fisk med så omfattende funn, og alle med funn over 20 ble samlet i kategori 3. Individuer som ikke hadde utfellinger i tverrsnitt, men som hadde utfellinger i lengdesnittet ble skåret som kategori 1.

Mineralholdige utfellinger (Von Kossa positive) i nyretubuli, utførsels ganger eller interstitielt vev, med eventuelle sekundære vevsforandringer gir et relativt sikkert grunnlag for å diagnostisere NK. Blødning til nyretubuli/utførsels ganger er typisk for HSS. Ved histopatologisk diagnostikk vil en normalt også kunne basere en diagnose på multifokale blødninger i andre vev for eksempel hjertemuskulatur. Blod i et fåtall nyretubuli/samlerør kan sannsynligvis også oppstå av andre årsaker, inkludert at det presses blod inn i uriveiene ved tilskjæring/uttak av nyrepreparatet. Vi mener likevel at de sparsomme forandringene i kategori 1 gir en reell mulighet for tidligdiagnostikk av HSS og har valgt å følge den samme kategoriseringen for HSS som for NK.

Ved uttak av fisk i felt ble det for de fleste individene gjort en makroskopisk vurdering av nyreskade, etter modell av Marin Helse AS (Se Vedlegg 1). Dette er en skår for NK, mens for HSS hadde vi ikke en slik mal for makroskopisk skåring.

### **Klinisk kjemi og hematokritt**

Heparinisert fullblod (en dråpe Heparin 500 IE/ml dradd opp i 1ml sprøyte før blodprøvetaking) ble overført til kapillær-rør for hematokritanalyse, før sentrifugering (10 min, 5000 rpm) og overføring av plasma til nye rør for innfrysing og mellomlagring evt. direkte forsendelse i kjølepakke til analyselaboratorium (PHARMAQ Analytiq). Hematokritt (Hkt) ble målt på ferskt heparinisert fullblod i kapillærrør etter sentrifugering med Pro-Vet Centrifuge (12,000 rpm, 5min). Hkt-verdien er andelen (i %) av blodsøylen som er utgjort av røde blodceller etter separering av plasma, hvite og røde blodceller. Plasmaanalyse av natrium, klorid, kalsium, fosfor og albumin ble utført på 515 individer fra 32 forskjellige hoveduttak i ferskvann og sjø. I tillegg ble det i en innledende pilotstudie analysert for kreatinin, laktat dehydrogenase (LDH), totalprotein og kalium i to hoveduttak med tilsammen 41 individer. Analysene ble utført hos PHARMAQ Analytic (Fish Vet Group) ved bruk av ABX Pentra kits (Horiba Medical, Irvine, CA) på en ABX Pentra C400 (Horiba Medical, Irvine, CA) i henhold til leverandørens anvisninger. Av de analyttene som var inkludert i pilotundersøkelsen valgte vi å gå videre med fem, det ble gjort for å utnytte det volumet av plasma vi hadde og av budsjettmessige hensyn. Natrium, klorid, kalsium, fosfor og albumin ble valgt ut i fra antatt relevans i forhold til NK og HSS. Data fra klinisk kjemi er i denne rapporten analysert og presentert uten fjerning av potensielle uteliggere.

Prøver fra utfellinger i nyre ble analysert med infrarød spektroskopi ved Akershus universitetssykehus og sammenlignet med utfellinger fra de eksperimentelle studiene, dette er rapportert i kapittel 4.

### **Vannkvalitet**

Vannprøver ble tatt ut på anleggene på gasstette prøveflasker (serumbottles), pH og total karbonat ble målt samme dag som prøvene ble hentet med et Thermo Orion instrument koblet til en Ross pH-elektrode og en Thermo Orion CO<sub>2</sub>-elektrode. Ved lang transportavstand før måling ble flaskene transportert nedkjølte og sendt i over natten pakker. Flaskene ble så tempererte og målingene ble utført ved 21-22 °C. CO<sub>2</sub>-konsentrasjoner ble beregnet fra total karbonat-, pH- og likevektkonstanter ved den temperaturen som var i anlegget.

## 2.3 RESULTAT

### Forekomst av NK og HSS i ferskvann og sjø

Det ble i perioden oktober 2019 til august 2021 tatt ut til sammen 562 fisk fra 6 settefiskanlegg (A til F) og 268 prøver fra sjøanlegg etter utsett. Fra to av settefiskanleggene (A og D) ble det tatt prøver i to sesonger (2019 – 2020 og 2020 – 2021). Histologisk vurdering av nyrevev ble gjort på til sammen 829 prøver, makroskopisk vurdering av nyre på 637 fisk, hematokrit (Hk) ble registrert på 403 fisk, plasmaprøver ble analysert fra 442 fisk. Fisk tatt ut på settefiskanlegg hadde en gjennomsnittsvekt (SD) på 97 (57) g og en kondisjonsfaktor på 1,21 (0,15). Fisk i sjøanleggene hadde en snittvekt (SD) på 373 (198) g og en kondisjonsfaktor på 1,24 (0,26).

Der det ikke ble påvist NK i tverrsnitt av nyre (n = 627), hadde 7,7 % (n = 48) utfellinger i lengdesnittet. Disse individene fikk NK skår = 1, på samme måte som fisk med 1 – 5 utfellinger i tverrsnittet. Prevalens for NK (grad 1 – 3) i alle settefiskprøvene var 35,8 %, med variasjon mellom anleggene fra 8,3 til 64,3 % (Tabell 2.1., Figur 2.1.). Av disse påvisningene var 59,8 % milde forandringer (1 til 5 tubuli med utfellinger i tverrsnitt av nyret, eller negativt tverrsnitt og påvisning av utfellinger i lengdesnitt), 25,4 % moderate (6 – 20 tubuli) og 14,8 % kraftige forandringer (>20 tubuli).

Tabell 2.1. Samlet antall nyreprøver undersøkt og prevalens (%) av nefrokalsinose (NK) i settefiskanlegg og sjøanlegg, data fra 15.10.2019 - 25.08.2021. Skåring av histopatologiske forandringer i tubuli og samlerør: 0 = ikke påvist, 1 = mild, 1 – 5 affiserte\*, 2 = moderat, 6 – 20, 3 = uttalt, >20.

Anlegg	NK settefisk					NK sjø				
	Antall	0	1	2	3	Antall	0	1	2	3
A	130	80,0	15,4	4,6	0,0	40	92,5	7,5	0,0	0,0
B	90	85,6	12,2	2,2	0,0	38	47,4	34,2	15,8	2,6
C	72	91,7	6,9	1,4	0,0	40	95,0	2,5	2,5	0,0
D	140	35,7	31,4	21,4	11,4	71	63,4	21,1	11,3	4,2
E	60	45,0	48,3	6,7	0,0	40	97,5	2,5	0,0	0,0
F	70	52,9	15,7	11,4	20,0	39	94,9	5,1	0,0	0,0
SUM	562	64,2	21,4	9,1	5,3	268	79,9	13,1	5,6	1,5

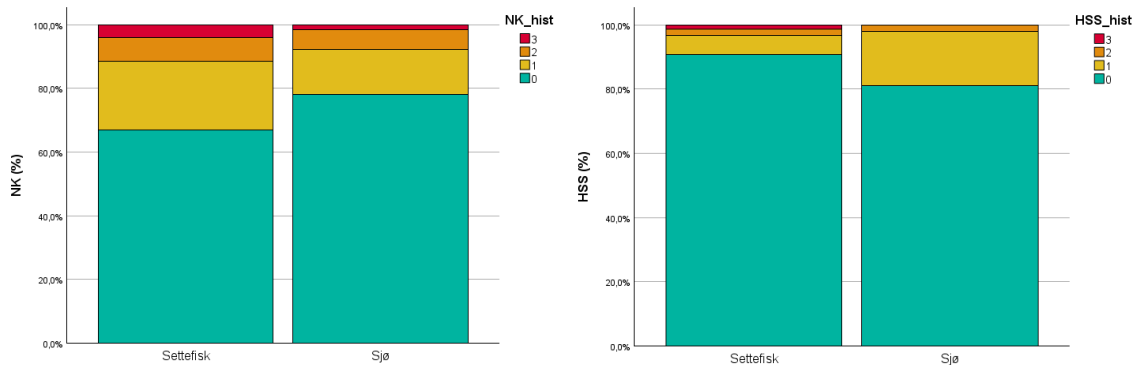
\*: prøver ble også regnet som NK positive ved påvisning av utfellinger kun i lengdesnitt av nyre.

Tabell 2.2. Samlet antall nyreprøver undersøkt og prevalens (%) av hemorragisk smoltsyndrom (HSS\*) i settefiskanlegg og sjøanlegg. Skåring av histopatologiske forandringer i tubuli og samlerør: 0 = ikke påvist, 1 = mild, 1 – 5, 2 = moderat, 6 – 20, 3 = uttalt, >20.

Gruppe	HSS settefisk					HSS sjø				
	Antall	0	1	2	3	Antall	0	1	2	3
A	130	96,2	3,8	0,0	0,0	40	95,0	5,0	0,0	0,0
B	89	77,5	9,0	7,9	5,6	39	94,9	5,1	0,0	0,0
C	72	98,6	1,4	0,0	0,0	40	100,0	0,0	0,0	0,0
D	140	85,7	11,4	2,9	0,0	71	57,7	35,2	7,0	0,0
E	60	96,7	3,3	0,0	0,0	40	62,5	35,0	2,5	0,0
F	70	82,9	12,9	2,9	1,4	39	97,4	2,6	0,0	0,0
SUM	561	89,3	7,3	2,3	1,1	269	81,4	16,4	2,2	0,0

\*: Blod i tubuli og/eller utførsels ganger tolket som sannsynlig HSS.

Etter utsett i sjø var prevalens av NK 20,1 %, med 13,1 % milde forandringer, 5,6 % moderate og 1,5 % kraftige forandringer. For HSS var prevalens i settefiskprøvene 10,7 %, med 7,3 % milde forandringer, 2,3 % moderate og 1,1 % alvorlige. I sjø var prevalens 18,6 %, med 16,4 % milde og 2,2 % moderate forandringer (Tabell 2.2., Figur 2.1.).

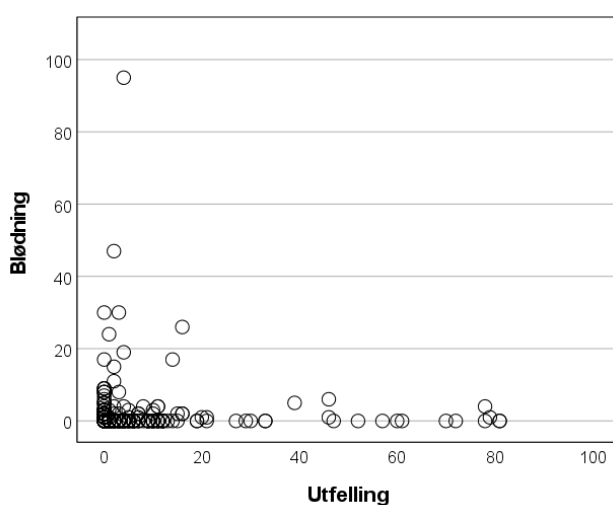


Figur 2.1. Fordeling av histopatologisk skår (grad 0 til 3) fra 6 settefiskanlegg før og etter utsett i sjø, data fra 15.10.2019 - 25.08.2021. Nefrokalsinose (NK) til venstre, hemorragisk smoltsyndrom (HSS) til høyre.

I det samlede materialet var det en sammenheng i påvisning av NK og HSS (kategorisert som 0 = ikke påvist og 1 = påvist) i prøver fra samme fisk ( $p < 0,001$ , Chi-kvadrat). Fordeling av NK-skår hos fisk med eller uten påvisning av HSS er vist i Tabell 2.3 Et plot av antall tubuli og samlerør med utfelling mot tubuli og samlerør med blødning (i samme fisk) er vist i Figur 2.2.

Tabell 2.3. Påvisning av HSS (0 = ikke påvist, 1 = påvist), fordelt på histopatologisk skår for NK (0 – 3).

HSS	NK				SUM
	0	1	2	3	
0	511	126	41	16	694
1	51	24	14	6	95
SUM	562	150	55	22	789

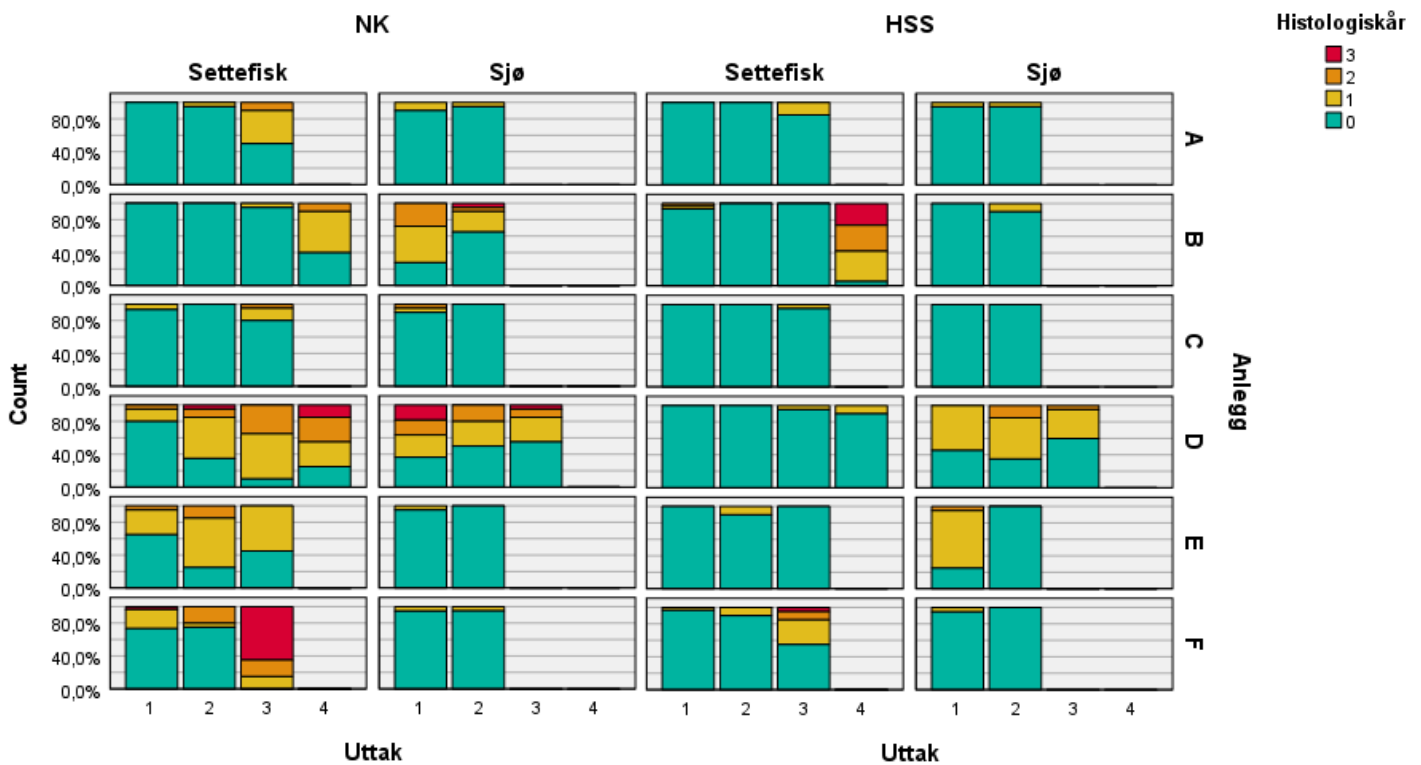


Figur 2.2. Antall tubuli og samlerør med mineralutfellinger (x-aksen), plottet mot antall tubuli og samlerør med blødninger (y-aksen) i samme fisk.

## Økt forekomst fram mot siste uttak i ferskvann

For NK var det en klar trend til økende forekomst av histopatologiske endringer i nyret fram mot siste uttak i ferskvann på de fleste anleggene (Figur 2.3.), men med store variasjoner mellom anleggene, se også Figur 2.5. Ukentlige prøveuttak. En lignende trend så vi også for HSS. Mest dramatisk var dette for NK på anlegg D og F og for HSS på anlegg B. For den andre prøvesesongen på anlegg D (mars til juni 2021) ble det påvist mest HSS på uttaket i mars, og så en gradvis reduksjon fram mot utsett. På anlegg E var mønsteret litt annerledes, med høyest prevalens av skader på midtuttaket i ferskvann, men det vi så av ukentlige prøveuttak i to anlegg indikerer også at det kan være en mer detaljert dynamikk for utvikling av sykdom over tid og som ikke fanges opp med bare tre til fire uttak.

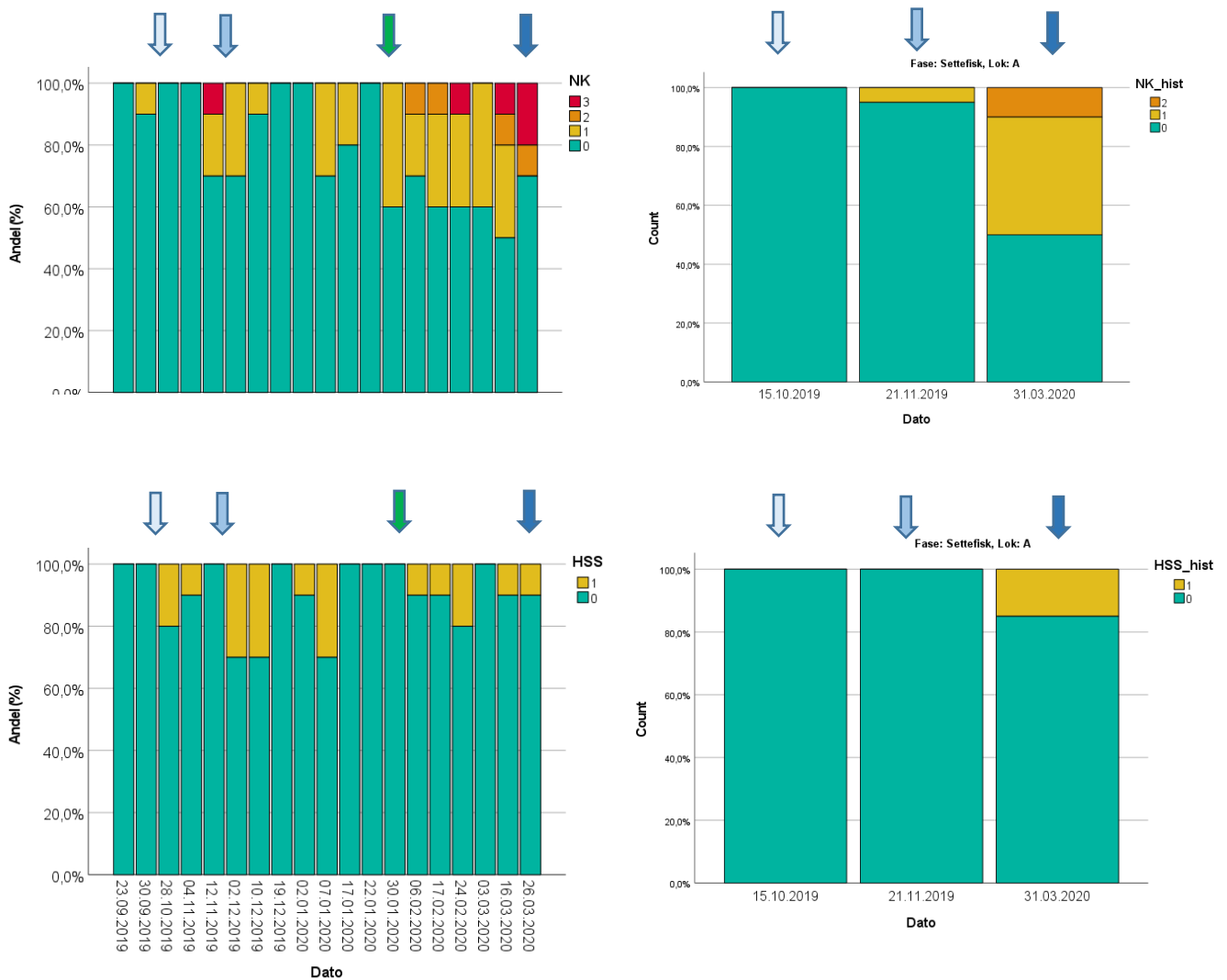
Situasjonen etter utsett i sjø var mer varierende, særlig på anlegg D, der det ble påvist både NK og HSS ved alle tre uttak i sjø. På fisk fra dette anlegget ble siste uttak i ferskvann tatt 21.april 2020, første uttak i sjø 6.mai, andre uttak 28.mai og siste uttak i sjø 23.juni.



Figur 2.3. Fordeling av histopatologisk skår (0 – 3) fra 6 settefiskanlegg før og etter utsett i sjø, data fra data fra hvert enkelt uttak. Nefrokalsinose (NK) til venstre, hemorragisk smoltsyndrom (HSS) til høyre, data fra den første delen av prosjektet: 15.10.2019 – 06.11.2020, fordelt etter uttakstidspunkt og om prøvene ble tatt på fisk i settefiskanlegg eller etter utsett i sjø.

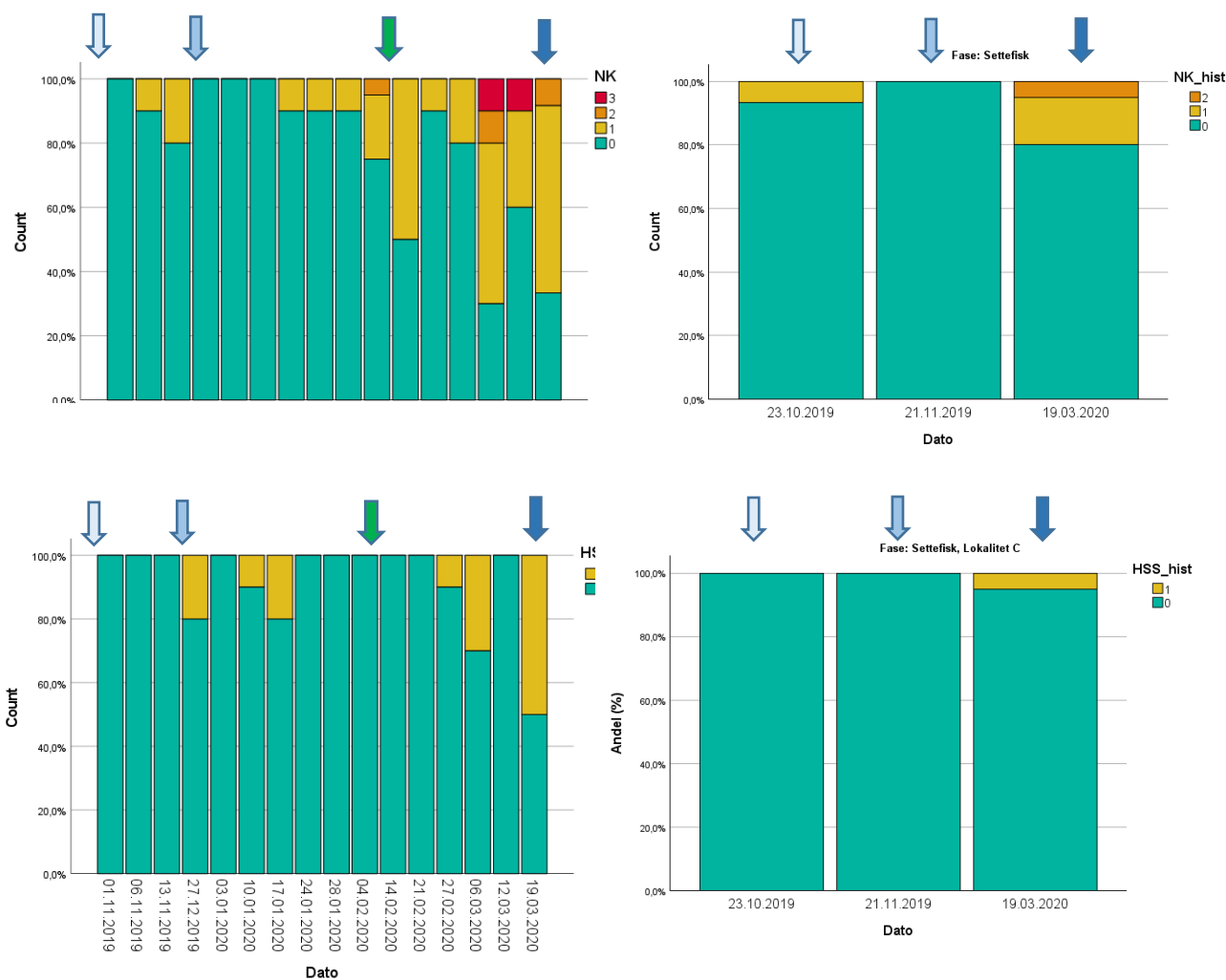
## Ukentlige prøveuttak i to anlegg

Fra anlegg A og C tok de ansatte ut ukentlige samleprøver av nyrevev (Figur 2.4., Figur 2.5.), i stor grad fra svimere og fersk dødfisk. Prøvematerialet fra hvert uttak besto av tversnitt av nyre fra 10 fisk, uten noen spesifikke registreringer av individdata. Fisk fra disse anleggene ble tatt inn i forsøk 1, Matre, se Kapittel 3.



Figur 2.4. Ukeprøver av nyre fra anlegg A, 23.09.2019 – 26.03.2020 (Venstre) og standarduttak i AP1 (høyre). Tidspunkt for standarduttakene er avmerket med piler over grafen. Grønn pil indikerer tidspunkt for overflytting av forsøksfisk til Forsøk 1, Matre. Tall for NK i øverste rad, HSS i nederste rad.





Figur 2.5. Ukeprøver av nyre fra anlegg C, 01.11.2019 - 19.03.2020 (venstre) og standardprøver i AP1 (høyre). Grønn pil indikerer tidspunkt for flytting av forsøksfisk til Forsøk 1, Matre. Tall for NK i øverste rad, HSS i nederste rad.

### Betydning av svimere og dødfisk

Av alle fisk som ble undersøkt der vi hadde opplysninger om klinikk (n=806), var det 86,1 % normale fisk, 13,3 % svimere og 0,6 % dødfisk (dødfisk ble bare tatt ut fra sjøanlegg). Prevalens av NK og HSS var generelt langt høyere blant svimere (NK = 55,4 %, HSS = 39,3 %) enn normal fisk (NK = 25,3 %, HSS = 8,3 %), og prevalens av HSS i dødfisk etter sjøsetting fra anlegg D var også høyere enn i normal fisk fra samme uttak. Lokalitetene med størst forekomst av NK og HSS, Anlegg B, D og F, var også de stedene der det ble tatt ut flest prøver fra svimere. På anlegg B gjaldt det særlig uttak 3 og 4 i ferskvann og uttak 5 i sjø, på anlegg D de to første uttakene i sjø og på Anlegg F uttak 1 og 3 i ferskvann.

En tolkning av dette er at der forekomsten av NK eller HSS var høyest var også helsetilstanden i anlegget såpass påvirket at det ble tatt ut flere svimere. I anlegg D var det en tydelig økt dødelighet etter utsett i sjø, knyttet til forekomst av alvorlig NK. I andre tilfeller var det mer usikkert om fisk som ble tatt ut som svimere var syke av NK eller HSS, eller om de hadde andre sykdommer med NK og HSS som tilleggssfunn. På generell basis er det uansett slik at prøvetaking av svimere og dødfisk øker mulighetene for å påvise sykdom i populasjonen og dette vil gi en overestimert prevalens av alle sykdommer som kan gi klinisk sykdom (her sviming) og død. Undersøkelse av svimere og dødfisk er hensiktsmessig i situasjoner hvor man ønsker tidlig oppdagelse av helseproblemer, mens tilfeldig uttak

av fisk må tilstrebtes hvis man er ute etter et godt estimat på den sanne prevalensen av sykdommen det fokuseres på.

Ukeprøvene ga et mer detaljert bilde av utviklingen i anleggene, og ser ut til å avdekke mer klinikk og flere fisk med høyere skåring, særlig for NK. At noen samleprøver også kan ha blitt tatt fra svimere og død fisk kan være med på å forklare forskjellen i prevalens mellom ukeprøvene og de mer regulære uttakene i samme anlegg. Det er likevel interessant at det skjedde en merkbar utvikling av både NK og HSS i de kommersielle anleggene etter overføring av fisk til Forsøk 1 (Matre), mens vi der ikke klarte å framprovosere noen av sykdommene (10 °C, 3 – 16 mg/L CO<sub>2</sub>, 1 - 7 ppt salinitet), se *Kapittel 3*.

### Andre histopatologiske funn

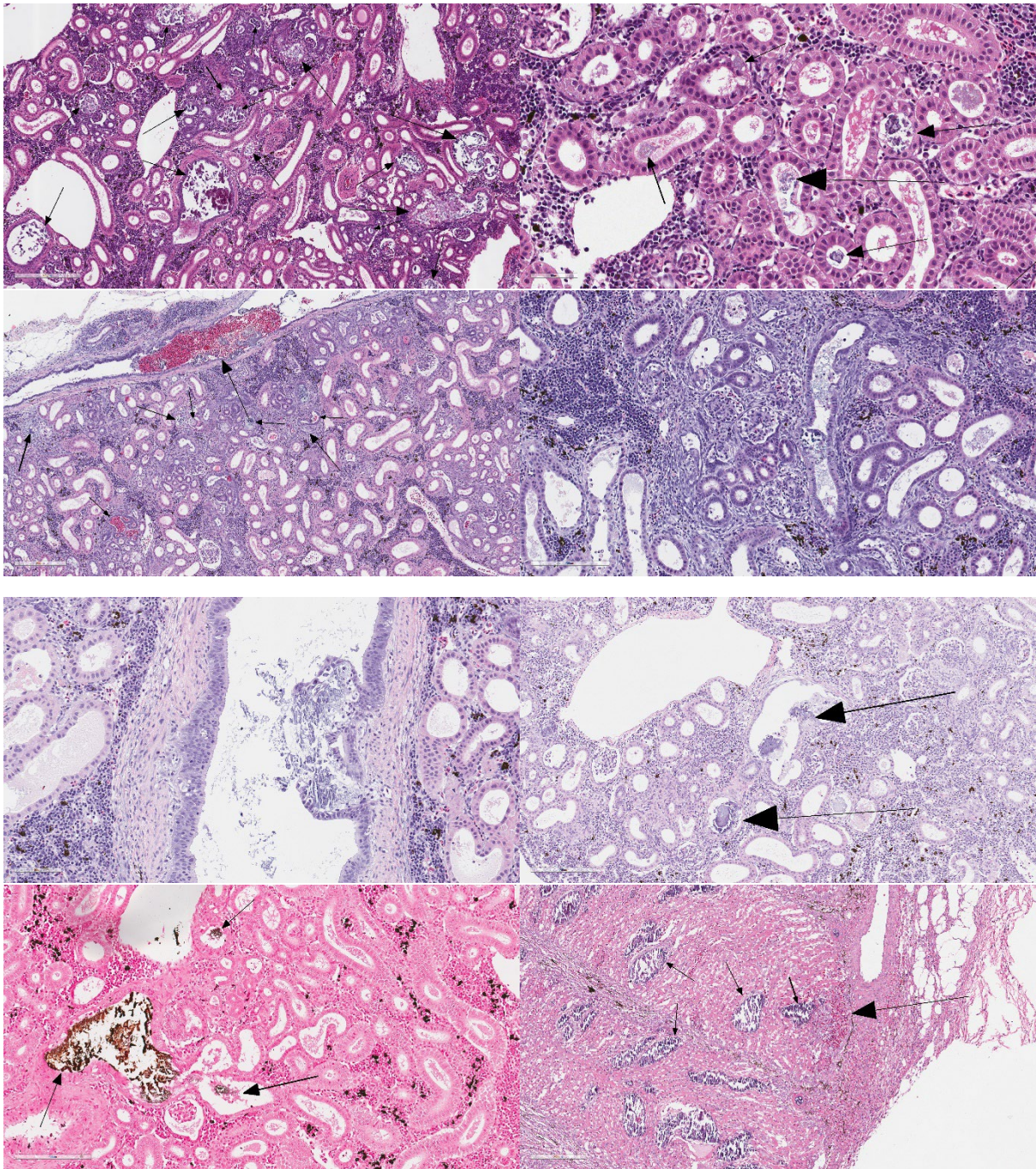
Interstitielle utfellinger ble påvist hos 4,1 % av alle NK positive fisk og i økende grad med økt antall affiserte tubuli ( $p < 0,01$ , Fisher's exact test). Mineralutfellinger i interstitielt nyrevev ble bare påvist i nyrer der det også ble påvist utfellinger i tubuli og samlerør. Funn av slike interstitielle mineralutfellinger var stort sett tett knyttet til samlerør med store forandringer, betydelige utfellinger og interstitiell bindevevsdannelse. Forandringene indikerte etter vår mening oftest destruksjon av vegg i samlerør, kontakt mellom interstitium og innhold fra urinveier (inkludert mineralutfellinger) med påfølgende inflammatoriske forandringer.

Utfellinger i pseudobrank ble påvist i 6,6 % av alle undersøkte prøver. Vi fant mineralutfellinger i pseudobrank fra 2,6 % av alle fisk uten forandringer i nyre, men også her var det økende prevalens av funn med økende NK skår i nyre ( $p < 0,01$ , Fisher's exact test), med 63,6 % fisk med funn i pseudobrank av alle fisk med NK skår = 3.

Blødninger i interstitielt vev var et sjeldent funn i dette materialet (1,6 %) og med en tendens til å øke i utbredelse med økende HSS skår (få fisk, ikke analysert).

I nyrevev ble det i tillegg til registrering av mineralutfellinger og blødning til urinveier registrert fravær/forekomst av debris (rester av døde celler) i tubuli og samlerør, proteinrikt (eosinofilt) materiale i tubulilumina (urinveier), eosinofile granula i tubuliepitel, nekrose (celledød) i tubuliepitelet, interstitielle reaktive forandringer i form av betennelse og fibroplasi (arrvevsdannelse), utbredelse av tubulær dilatasjon (utvidelse av små urinveier) og andre typer utfellinger (ikke basofile og kalkliknende mineralutfellinger). Disse dataene er ikke analysert nærmere. Det var vanlig å finne debris og tubulær nekrose hos individer med HSS-forandringer og eller NK-forandringer. Det ble også påvist sporadisk fokale gulbrune utfellinger i urinveier og interstitiet hos fisk med HSS og/eller NK.

Et utvalg av histopatologi fra funn fra nyre og pseudobrank er vist i *Figur 2.6*.



Figur 2.6. Histopatologi fra nyre og pseudobranch. Et utvalg histopatologiske funn fra undersøkte individer.

Figur 2.6.1: (kolonne 1, rad 1) Nyre. Multifokal forekomst av kalkliknende materiale i tubuli og samlerør og dilatasjon av tubuli og samlerør. Farging: Hematoksilin og eosin (HE).

Figur 2.6.2: (kolonne 2, rad 1) Nyre. Multifokal forekomst av kalkliknende materiale i tubuli. Forekomst av eosinofilt proteinrikt materiale i tubuli. Farging: HE.

Figur 2.6.3: (kolonne 1, rad 2) Nyre. Multifokal forekomst av kalkliknende materiale og blod (røde blodlegemer) i tubuli og samlerør. I tillegg er det kroniske interstielle forandringer i form av bindevevsdannelse. Farging: HE.

Figur 2.6.4: (kolonne 2, rad 2) Nyre. Kalkliknende materiale i et samlerør. Tubulært debris (cellerester) og nekrose (celledød) i epitelet. Kroniske interstielle forandringer i form av bindevevsdannelse. Farging: HE.

Figur 2.6.5: (kolonne 1, rad 3) Nyre. Fokal forekomst av kalkliknende materiale i større utførselsgang. Utfellingen er delvis dekket av epitel. Farging: HE.

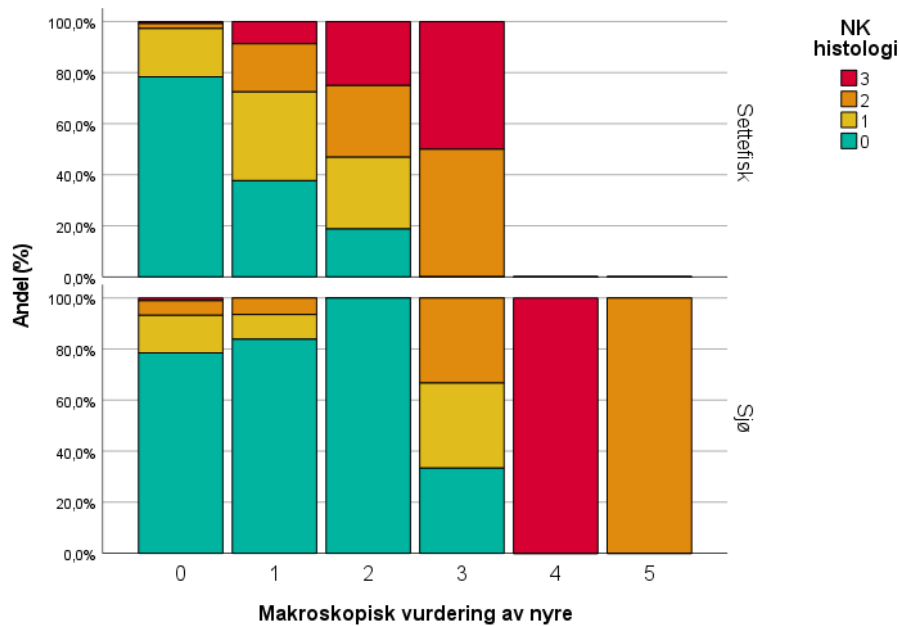
Figur 2.6.6: (kolonne 2, rad 3) Nyre. Multifokal forekomst av kalkliknende materiale i samlerør. Farging: HE.

Figur 2.6.7: (kolonne 1, rad 4) Nyre. Kalkholdige utfellinger i tubuli og samlerør. Farging: Von Kossa.

Figur 2.6.8: (kolonne 2, rad 4) Pseudobranchie. Multifokale utfellinger av kalkliknende materiale og fokal blødning. Farging: HE.

## Sammenheng morfologi og histopatologi

Makroskår av nyret ble gjort på 637 fisk, 402 i ferskvann og 235 i sjø, se *Figur 2.7*. I ferskvann ble det ikke gitt noen makroskår i kategori 4 og 5. I sjøfasen ble det skåret bare 8 fisk i kategoriene 3 til 5, og før statistisk vurdering ble makrokategori 2 til 5 i prøver fra sjø slått sammen til en kategori. Sammenhengen mellom makroskopisk og histologisk skår i ferskvann og sjøvann ble så undersøkt med Chi-square test. For prøver fra settefisk var det en signifikant sammenheng mellom makroskopisk og histologisk vurdering ( $p < 0,01$ ), mens for prøver tatt ut i sjø var resultatet mer uryddig.



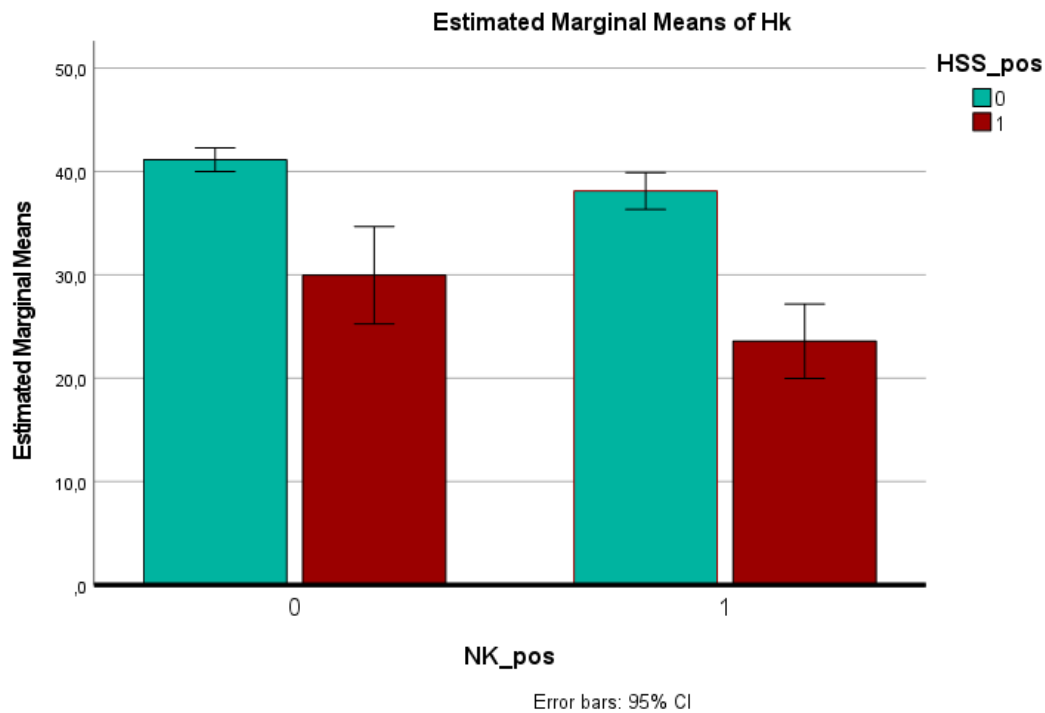
*Figur 2.7. Sammenligning mellom makroskopisk skåring av NK (0 – 5) og histopatologisk skåring (0 – 3). Alle data fra AP1, fordelt på prøver i settefiskfasen og sjøanlegg.*

På det siste uttaket i ferskvann, der det var størst kliniske forandringer, ble vekt, lengde og kondisjonsfaktor sammenlignet for fisk med og uten påvist HSS og NK (toveis ANOVA). Fisk med HSS hadde signifikant større vekt og lengde enn fisk uten HSS ( $p < 0,01$ ), og samtidig en noe redusert kondisjonsfaktor ( $p = 0,046$ ). Diagnose av NK hadde ingen sammenheng med vekt, lengde eller kondisjonsfaktor. Det var heller ingen signifikant interaksjon ved kombinert diagnose NK og HSS. I ferskvann var det en sammenheng ( $p < 0,01$ , Fisher's exact) mellom skåring av blankhet og synlige parrmerker (0 til 3) og forekomst av både NK og HSS (kategorisert som 0 = ikke påvist og 1 = påvist). I sjøvann var det ikke noen slik sammenheng. Fisk i ferskvann som hadde patologiske forandringer i nyret hadde med andre ord også mindre synlige parrmerker og bedre utviklet sølvfarge enn normal fisk. At fisk med HSS generelt er av den største og blankeste fisken er en vanlig oppfatning ute på anleggene, men dette funnet i datasettet kan naturligvis også være påvirket av at forekomsten av både NK og HSS øker gjennom produksjonstiden fram mot utsett.

## Hematokrit

Hematokrit (Hk) angir hvor stor prosent av blodvolumet som utgjøres av røde blodceller. Hk ble målt på 377 fisk fra settefiskanlegg og 26 fisk fra sjøanlegg. Det var svært stor spredning i resultatene, med verdier fra 5 til 59 %. Snittverdien (SD) i settefisk var 38,8 (10,06) %, i sjøanlegg 37,6 (5,57) %.

Sammenhengen mellom målt Hk og påvisning av NK og HSS (registrert som 0 eller 1) i prøver fra settefiskanlegg ble analysert med toveis ANOVA, og snittverdier (SE) er vist i *Figur 2.8.* og *Tabell 2.4.* Det var en signifikant reduksjon i Hk ved både NK og HSS ( $p < 0,01$ ), men klart størst utslag ved påvisning av HSS (*Figur 2.5., Tabell 2.3.*). Det var også tendens til en redusert Hk ved kombinert NK og HSS i samme fisk, men denne interaksjonen var ikke signifikant ( $p = 0,296$ ). Fra sjøanlegg var det for få prøver til å si noe sikkert om disse sammenhengene.

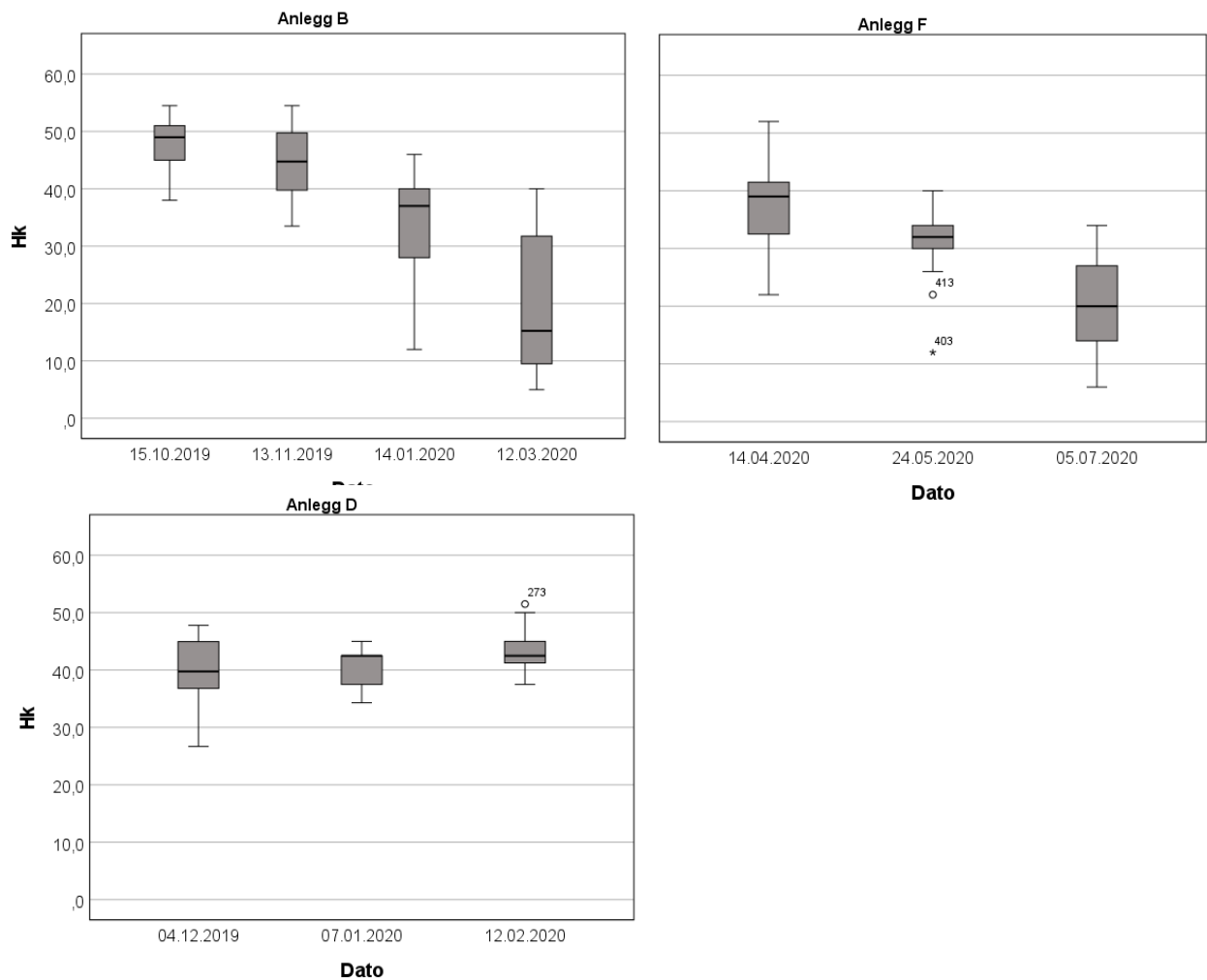


*Figur 2.8.* Verdier for hematokrit (Hk), hos fisk med og uten NK og med og uten HSS.

*Tabell 2.4.* Snittverdier (SE) av Hk %, alle prøver fra settefisk i ferskvann, gruppert etter histopatologisk påvisning av NK og HSS i nyre. Antall prøver: 377.

	NK -	NK +	ALLE
HSS -	41,1 (0,59)	38,1 (0,91)	39,6 (0,54)
HSS +	30,0 (2,40)	23,6 (1,83)	26,8 (1,51)
ALLE	35,6 (1,23)	30,9 (1,02)	38,8 (0,50)

Utviklingen av Hk over tid var svært ulik i anlegg med klinisk HSS i settefiskfasen (Anlegg B og F), sammenlignet med de fire andre anleggene. Utviklingen i anlegg B og F er vist i *Figur 2.9.*, anlegg D som eksempel på resultater fra anlegg uten HSS. I anlegg B var det en signifikant reduksjon av Hk fra uttak 2 til uttak 3 (enveis ANOVA,  $p < 0,001$ ), og en ytterligere reduksjon fra uttak 3 til uttak 4 ( $p < 0,001$ ). På anlegg F var det en signifikant reduksjon av Hk fra uttak 1 til uttak 2 ( $p = 0,005$ ) og fra uttak 2 til uttak 3 ( $p < 0,001$ ).



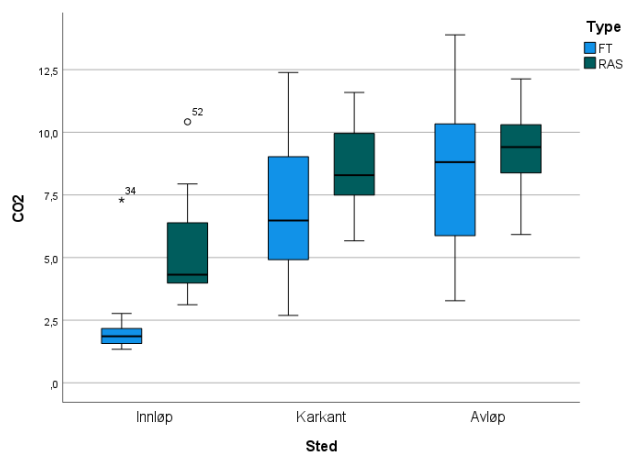
Figur 2.9. Utvikling av hematokrit (Hk) i tre settefiskanlegg. Anlegg B og F hadde høy prevalens av HSS i siste uttak før sjøsetting (Se Figur 2.2), mens anlegg D hadde få påvisninger av HSS i settefiskperioden.

### Vannkvalitet og driftsforhold

Det ble tatt seriemålinger på lokalitet A, C og D, anlegg A og D med gjennomstrømming, anlegg C med RAS, færre målinger på de øvrige anleggene (Tabell 2.5, Figur 2.10, Vedlegg 3). Verdier for CO<sub>2</sub> i kar lå mellom 2,7 og 13,9 mg/L. Fra to uttak i anlegg A og tre uttak i anlegg C ble det målt verdier av NH<sub>3</sub>-N. I anlegg A ble det målt 0,01 og 0,23 µg/L, i anlegg C ble det målt 0,42 til 1,189 µg/L.

I gjennomstrømningsanlegg var det en signifikant økning i CO<sub>2</sub> fra 2,2 mg/L i innløp til 7,1 mg/L ved karkant (Enveis ANOVA). Fra karkant til senter var det en ikke signifikant økning på 1,2 mg/L. I RAS anlegg var det færre prøver, høyere inngangsverdi for CO<sub>2</sub> i innløpsvannet, ingen signifikant forskjell i CO<sub>2</sub> mellom innløp og kar og mindre endring i CO<sub>2</sub> fra karkant til senter. I tidsseriene på anlegg A og C ble det påvist stabile eller fallende verdier for CO<sub>2</sub> i prøvetakingsperioden.

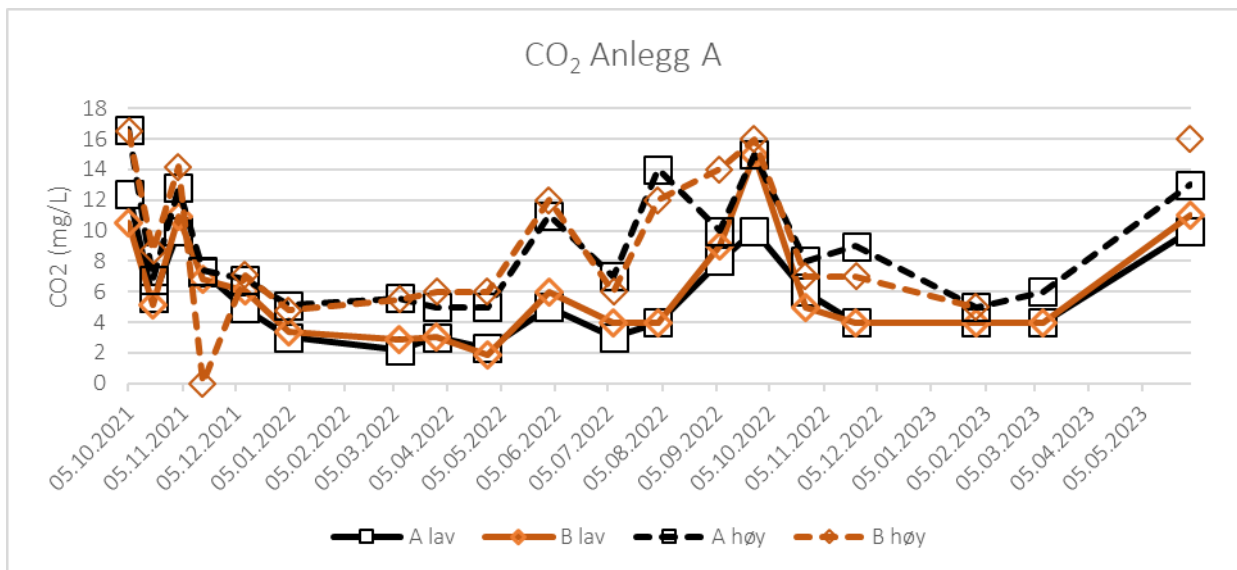
Fra anlegg ble det opplyst at nefrokalsinose i hovedsak ble observert litt i forkant av HSS, med en topp rett før utsett, og mest uttalt for vårsomt.



Figur 2.10. CO<sub>2</sub> målt i innløp, ved karkant og i senter, anlegg med gjennomstrømming og RAS.

Tabell 2.5. Verdier for CO<sub>2</sub> (mg/L) målt i kommersielle settefiskanlegg, innløp og inne i kar ved kant og i senter. Grønt = gjennomstrømming, gult = RAS.

	Dato	CO <sub>2</sub> (mg/L)		
		Innløp	Fiskekar	Avløp
A	15.10.2019	2,8	12,4	13,9
	21.11.2019	2,2	6,0	5,9
	10.12.2019	2,0	8,3	8,9
	19.12.2019	2,2	5,7	8,8
		2,0	8,2	8,7
	02.01.2020		6,2	6,4
		1,7	6,8	9,1
			4,1	5,8
	17.02.2020	1,5	4,0	5,1
	31.03.2020	1,6	2,7	3,3
B	17.10.2019	1,7	11,3	13,1
	14.01.2020	7,3	7,0	7,4
C	23.10.2019	4,8	6,8	7,6
	21.11.2019	4,3	5,7	5,9
	19.12.2019	10,4	8,3	9,2
	27.01.2020	7,9	11,6	12,1
			5,1	
	26.02.2020	3,1	8,9	9,4
	23.03.2020	4,0	8,2	9,6
E	30.01.2020	1,3	9,2	10,3
			8,8	10,4



Figur 2.11. CO<sub>2</sub> målt i anlegg A, to fiskegrupper (A og B), hver delt i kar med høy og lav belastning (biomasse).

Opplysninger om andre driftsforhold er gitt i Vedlegg 4. Av de tre anleggene med høyest prevalens av NK var anleggene D, E, F. Men det var fra anlegg B at det ble påvist mest NK i uttakene etter sjøsetting (52,6%). Anlegg D og F var RAS-anlegg, anlegg E gjennomstrømming. Det var noe ulik bruk av buffere og salinitet. Anlegg D gjennomførte smoltifisering med en gradvis økning av salinitet, anlegg E og F brukte kontinuerlig lys og smoltfôr. Høyest prevalens av HSS ble påvist i anleggene B, F og D.

De tre anleggene som hadde minst (< 15% prevalens) nefrokalsinose (A, B, C) i ferskvann hadde ulik grad av HSS, fra 1,4 til 22,5%. Alle disse tre brukte sjøvann som buffer. Anlegg A med lav salinitet, anlegg B og C med salinitet opp til 15 eller 19 promille. Alle disse tre anleggene brukte også en smoltprotokoll med mørkeperiode og med fullt lys fra vaksinerings.

### Klinisk kjemi

Ut fra pilottesten ble det vurdert som mest interessant å gå videre med disse fem parameterne: albumin, fosfor, natrium, klorid og kalsium. Verdiene for disse, delt på prøver tatt i settefiskanlegg og sjøanlegg, er vist i Tabell 2.6, korrelasjonen mellom verdiene er vist i Tabell 2.7. I tillegg finnes grafisk fremstilling av disse analysene for alle uttak og anlegg som vedlegg. Alle prøver ble tatt på fisk etter bedøvelse, og gjennomsnittsverdiene for fosfor, kalsium, natrium og klorid er innenfor de normalintervallene som ble foreslått av Klykken et al. (2022).

Verdier fra klinisk kjemi data i fisken fra ett av anleggene (D) er vist i Figur 2.12. Sammenstilling av alle disse dataene (Vedlegg 2) viste ingen entydige trekk med hensyn på utvikling langs tidsaksen, men viser at verdiene var relativt stabile og med liten individuell variasjon innad i gruppene ved de forskjellige uttakene. Vi ser i teksten nedenfor nærmere på verdiene for albumin, klorid, kalsium og fosfor.



Tabell 2.6. Plasmaverdier for albumin (g/dL), fosfor (P), natrium (Na), klorid (Cl) og kalsium (Ca), alle mineralverdier angitt som mMol/L, fordelt på prøver fra settefiskanlegg og sjøanlegg. Antall prøver (N), gjennomsnitt, standardavvik, minste og største verdi.

Settefisk	Albumin	P	Na	Cl	Ca
	g/dL				
N	332	334	335	335	333
Snitt	11,3	5,8	152,5	113,9	2,8
SD	4,32	1,96	12,50	17,20	0,68
Minst	1	2,7	82	18,1	0,5
Størst	20	17,6	238	217	3,9
Sjø	Albumin	P	Na	Cl	Ca
N	179	178	179	179	170
Mean	12,8	7,8	175,3	136,8	3,7
SD	3,50	4,42	18,60	24,60	0,66
Minst	2	2,9	151	15,8	1,7
Størst	20	26,7	244	223,1	6,3

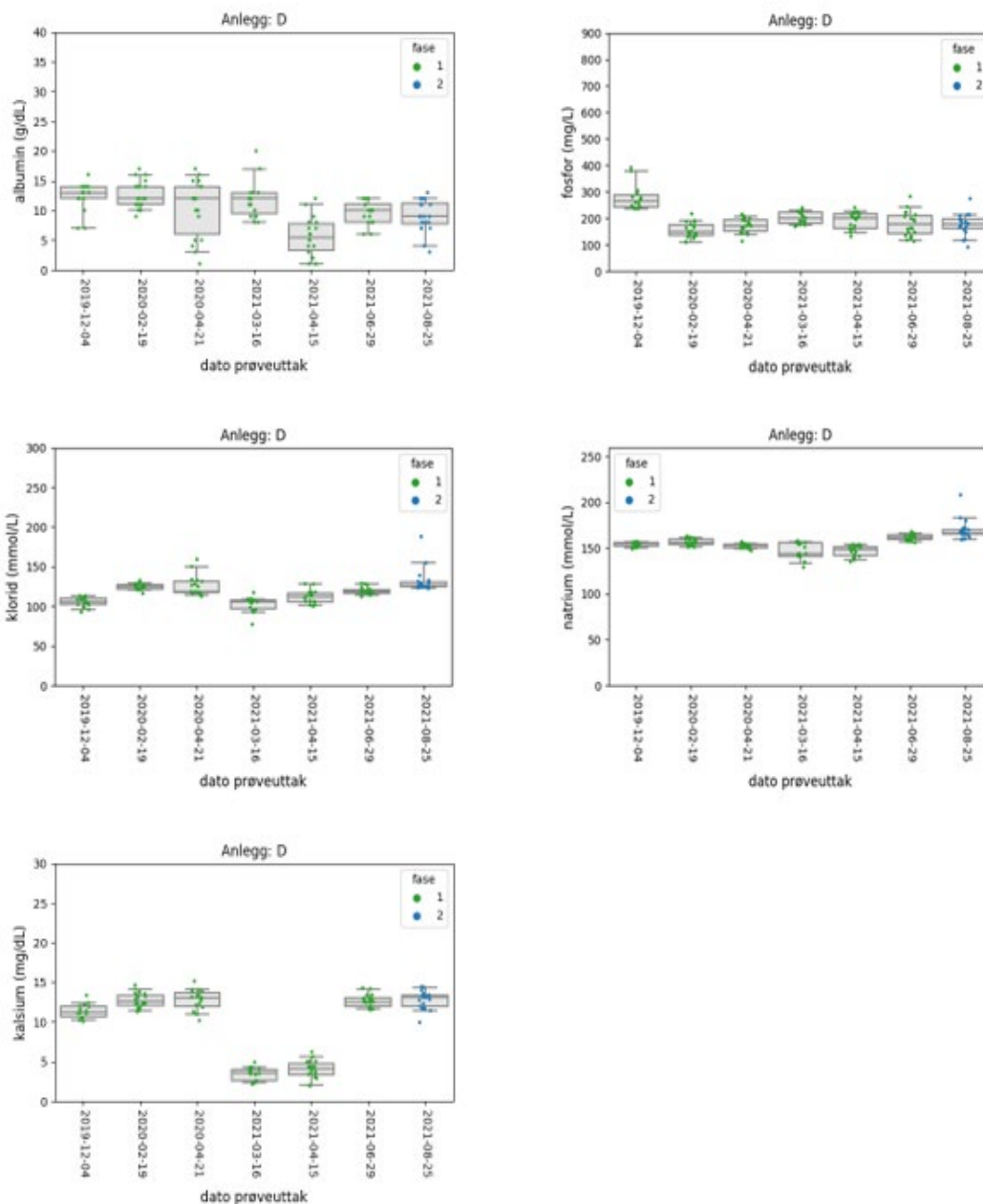
Korrelasjon (Pearsons) mellom Hk og de fem undersøkte plasmaverdiene i prøver tatt i settefiskanleggene er vist i Tabell 2.7.

Tabell 2.7. Korrelasjon (Pearsons) mellom hematokrit (Hk) og nivå av plasma albumin, fosfor, natrium, klorid og kalsium. Prøver fra 6 settefiskanlegg.

	Hk	Albumin	Fosfor	Natrium	Klorid	Kalsium
Hk		0,486**	0,068	-0,066	-0,117	0,342**
Albumin	0,486**		-0,018	-0,236**	-0,341**	0,431**
Fosfor	0,068	-0,018		0,127*	-0,075	-0,028
Natrium	-0,066	-0,236**	0,127*		0,801**	0,185**
Klorid	-0,117	-0,341**	-0,075	0,801**		0,110*
Kalsium	0,342**	0,431**	-0,028	0,185**	0,110*	

\*\* : signifikant ved 0,01

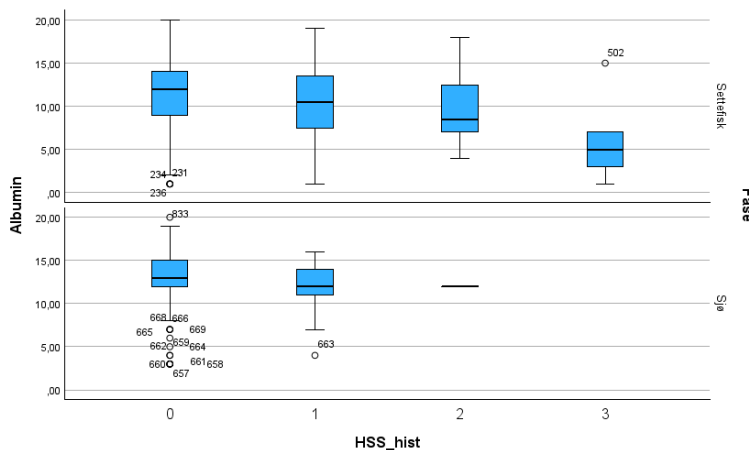
\* : signifikant ved 0,05



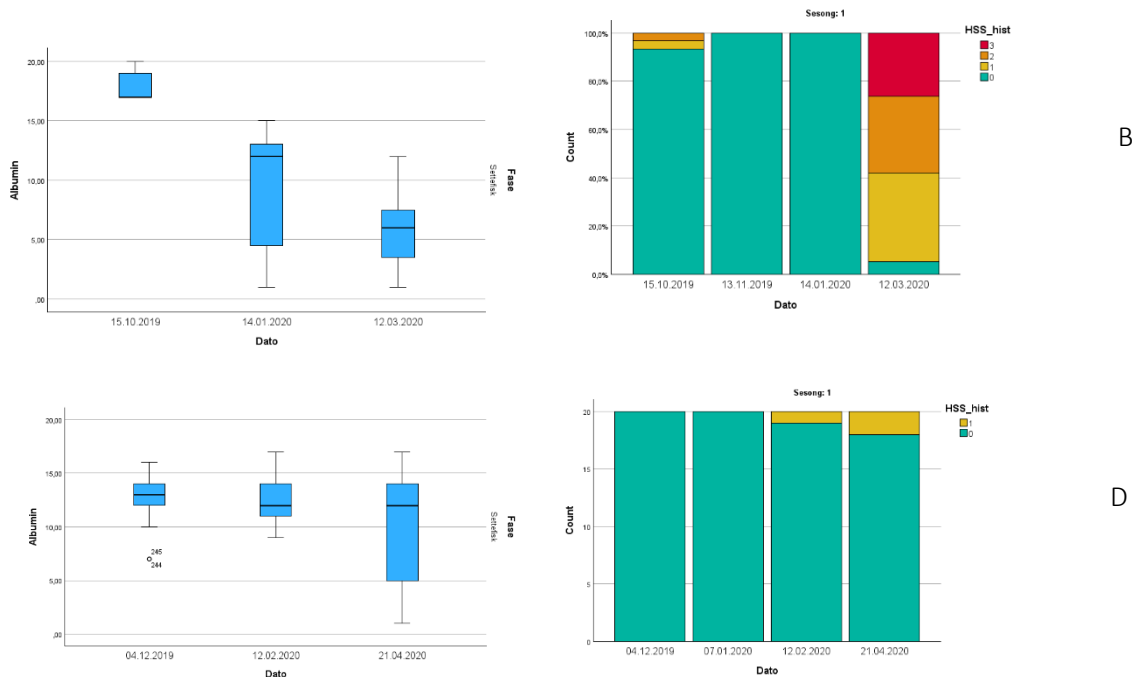
Figur 2.12. Plasma albumin, klorid, kalsium, fosfor og natrium for 7 ulike prøveuttak fra fisk fra anlegg D. Legg merke til at figuren viser 3 uttak i ferskvann år 1, tre uttak i ferskvann år 2 i tillegg til ett uttak fra sjø satt fisk år 2. I figuren er kalsium angitt i mg/dL og fosfor i mg/L.

## Plasma Albumin

Sammenligning av albumin hos settefisk før sjøsetting med ulik histopatologisk skår for HSS viste et signifikant lavere nivå i fisk med HSS skår 3 (Figur 2.13.) sammenlignet med frisk fisk (Enveis ANOVA,  $p = 0,002$ ), men med et lite antall fisk i den mest alvorlige kategorien ( $n = 6$ ). I sjøvann hadde vi færre prøver fra HSS-syk fisk og fant ingen statistisk sammenheng mellom HSS-skår og nivå av plasma albumin ( $p = 0,516$ ). Plasma albumin viste også en reduksjon over tid ved prøveuttak i anlegg der det ble påvist HSS før utsett (Figur 2.14.). Ved samme analyse for albumin og NK ble det ikke funnet sammenheng mellom histologisk skår for NK og plasmaverdier for albumin i ferskvann. Også her var det i sjøvann for få blodprøver fra NK positive fisk og for stor spredning i datamaterialet til å si noe sikkert om forskjeller mellom fisk med og uten NK (data ikke vist).



Figur 2.13. Boksplot som viser verdier av plasma albumin (g/dL) i prøver fra settefiskanlegg (øverst) og sjøanlegg (nederst), gruppert etter histopatologisk skår for HSS (0 – 3).

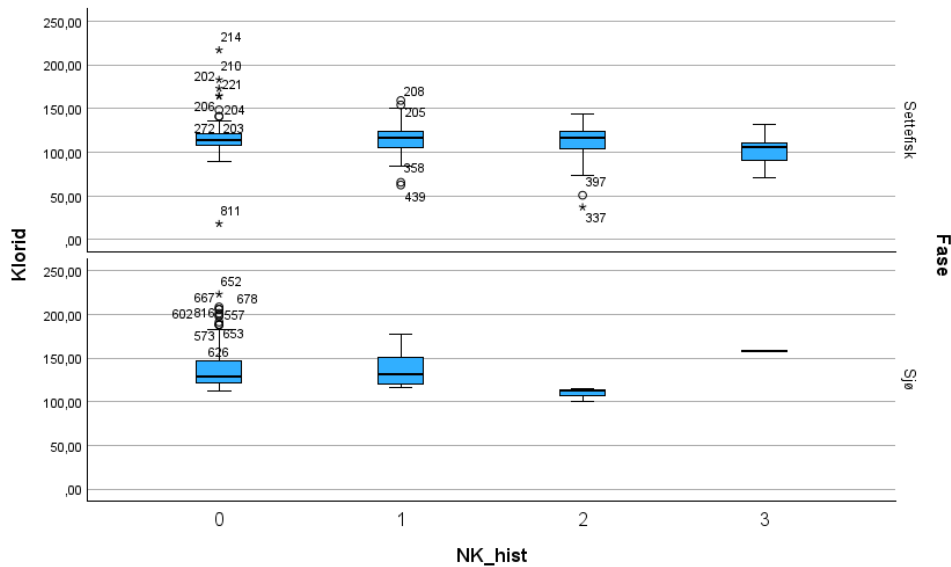


Figur 2.14. Plasma albumin (g/dL) (venstre) og histologisk skår for HSS (høyre) ved uttak i to settefiskanlegg. Lokalitet B øverst, lokalitet D nederst. Plasmaprøver fra tre uttak, histopatologi fra fire.

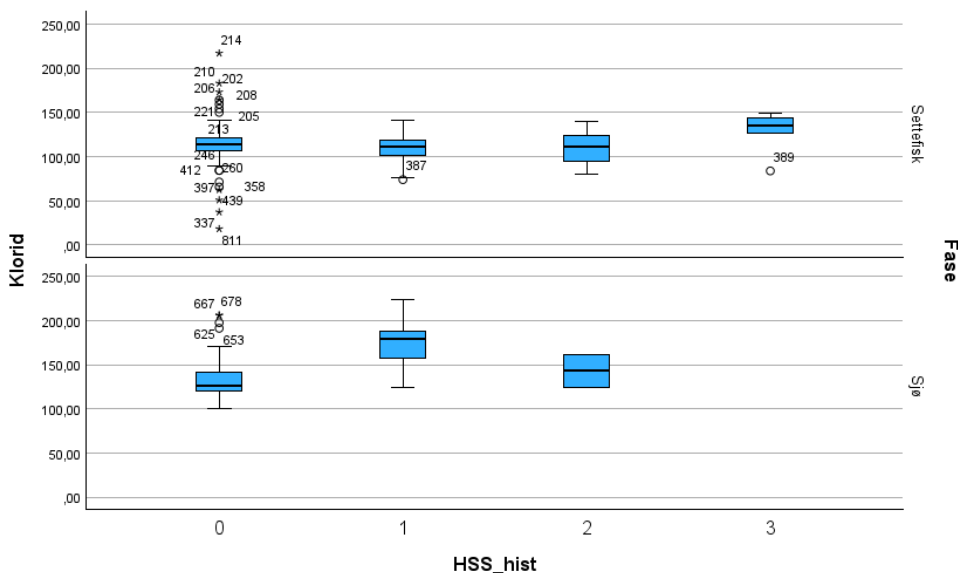
## Plasma klorid

Ved en toveis ANOVA var det signifikant lavere plasma klorid i fisk med påvist NK, der fisk med NK hadde en snittverdi (SE) på 110,0 (1,66) mMol/L, mens fisk uten NK hadde 118,5 (2,45) mMol/L ( $p=0,004$ ), det var også en gradvis reduksjon i plasma klorid med økende histologisk skår (Figur 2.15.).

I ferskvann var det høye kloridverdier i de få fiskene med HSS skår 3 (Figur 2.16.), men ingen signifikant forskjell mellom fisk med og uten HSS (Toveis ANOVA,  $p = 0,715$ ). I sjøvann var det høyest kloridverdier i fisk med HSS skår 1 ( $p < 0,001$ ).



Figur 2.15. Plot som viser verdier av plasma klorid (mMol/L) i prøver fra settefiskanlegg (øverst) og sjøanlegg (nederst), gruppert etter histopatologisk skår for NK (0 – 3).

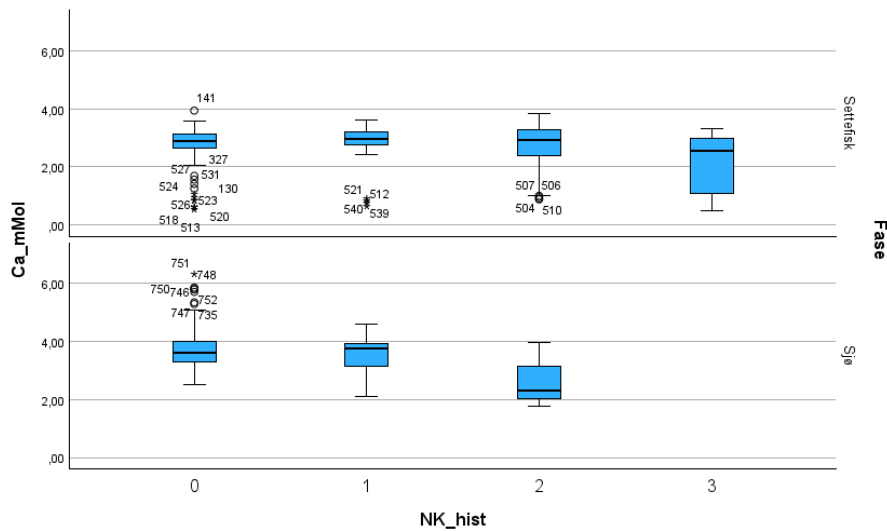


Figur 2.16. Plot som viser verdier av plasma klorid (mMol/L) i prøver fra settefiskanlegg (øverst) og sjøanlegg (nederst), gruppert etter histopatologisk skår for HSS (0 – 3).

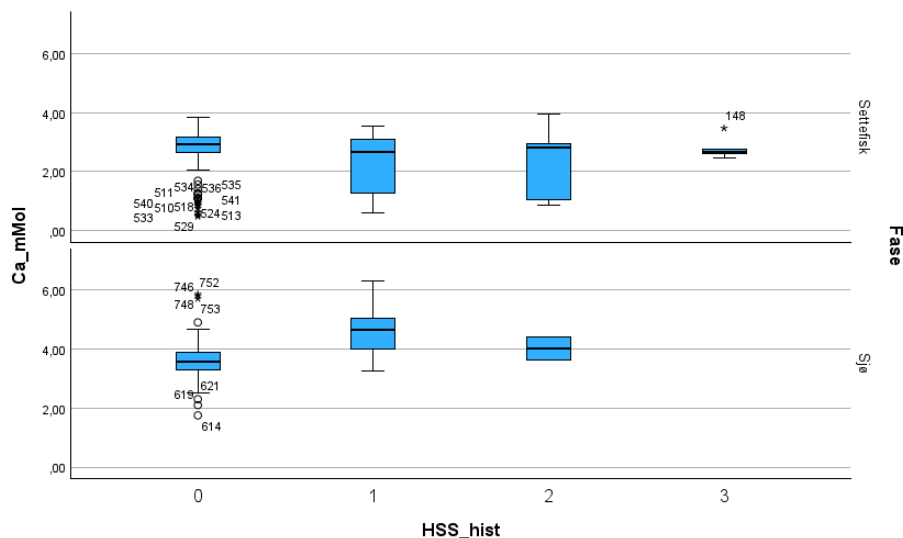
## Plasma kalsium

I ferskvann hadde fisk uten NK gjennomsnittlig (SE) plasma kalsium på 2,8 (0,10) mMol/L, fisk med NK hadde et signifikant lavere nivå med 2,5 (0,11) mMol/L ( $p = 0,048$ ) (Figur 2.17.). Fisk uten HSS hadde også gjennomsnittlig (SE) plasma kalsium på 2,8 (0,04) mMol/L og fisk med HSS hadde lavere plasma kalsium med 2,5 (0,11) mMol/L ( $p = 0,015$ ). Det var ingen interaksjon mellom NK og HSS for verdien av plasma kalsium i ferskvann (Toveis ANOVA,  $p = 0,105$ ).

I sjøvann steg verdiene for plasma kalsium, fisk uten NK hadde et gjennomsnitt (SE) på 4,1 (0,07) mMol/L, fisk med NK 3,9 (0,31) mMol/L, og her var det ingen statistisk forskjell. Fisk med HSS hadde et gjennomsnitt (SE) på 3,5 (0,09) mMol/L, fisk med HSS hadde signifikant økt ( $p < 0,001$ ) plasma kalsium (Figur 2.18.) med 4,6 (0,30) mMol/L. I sjøvann var det heller ingen interaksjon mellom NK og HSS ( $p = 0,505$ ).



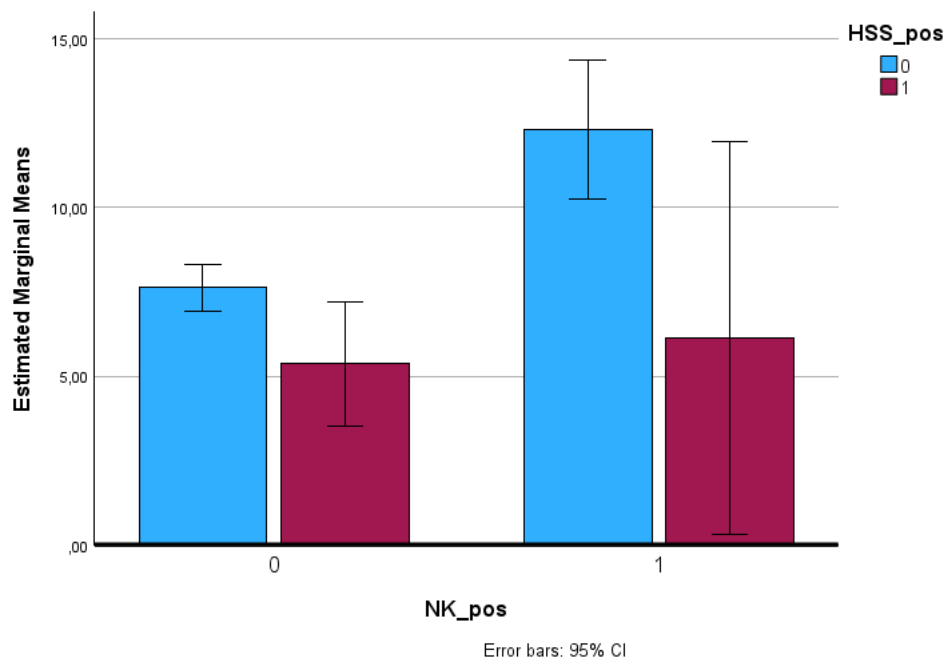
Figur 2.17. Plot som viser verdier av plasma kalsium (mMol/L) i prøver fra settefiskanlegg (øverst) og sjøanlegg (nederst), gruppert etter histopatologisk skår for NK (0 – 3).



Figur 2.18. Plot som viser verdier av plasma kalsium (mmol/L) i prøver fra settefiskanlegg (øverst) og sjøanlegg (nederst), gruppert etter histopatologisk skår for HSS (0 – 3).

## Plasma fosfor

I ferskvann var gjennomsnittlig (SE) verdi for plasma fosfor i settefiskfasen 5,8 (1,96) mMol/L og det var ingen statistiske forskjeller mellom fisk med eller uten NK og HSS. I sjøvann var gjennomsnittet (SE) 7,8 (4,42) mMol/L. Plasma fosfor økte hos fisk med NK (Figur 2.19), men på grunn av stor spredning i verdiene var forskjellen ikke signifikant, (Toveis ANOVA,  $p = 0,100$ ). Hos fisk med HSS var det en signifikant reduksjon av plasma fosfor ( $p = 0,011$ ), og det var ingen interaksjon mellom HSS og NK ( $p = 0,235$ ).



Figur 2.19. Verdier for plasma fosfor (mMol/L), hos fisk med og uten NK og med og uten HSS.

## 2.4 DISKUSJON

Prosjektet viste at NK og HSS var vanlig forekommende lidelser i de seks undersøkte settefiskanleggene og at høyest prevalens var mest vanlig i tida rett før og etter utsett til sjø, men med variasjon mellom anlegg og fiskegrupper. Forandringene var i hovedsak milde og moderate, men for enkelte av anleggene ble funnene også assosiert med forøket dødelighet. Disse funnene er i samsvar med det som ble funnet i settefiskanlegg i Midt-Norge (Klykken et al. 2023) og i de siste årenes fiskehelse rapport (Sommerset et al. 2021, 2022, 2023).

NK og HSS forekom til en viss grad parallelt i anleggene, og det var en moderat assosiasjon mellom påvisning av NK og HSS også på enkeltfisk. HSS ble påvist hos den største fisken, og både NK og HSS ble påvist hos fisk som hadde den best utviklede skjelldrakten og minst synlige parrmerker. I denne studien ble NK påvist samtidig med, eller tidligere enn HSS, og det ble ikke funnet noen støtte til hypotesen om at HSS kan fungere som en forløper for NK. Lignende observasjoner ble gjort i forsøk 2 (Kapittel 4 og 5). Det ble vist en viss assosiasjon mellom histopatologiske funn av NK og HSS i enkeltfisk, men ikke sammenheng mellom grad av NK sammenlignet med grad av HSS. NK og HSS ga også ulik effekt på hematokrit og plasmaverdier for albumin, klorid, kalsium og fosfor. Det at tilstandene i stor grad forekom parallelt, kan tyde på at de også kan utløses av de samme miljøbelastningene.

Økte verdier av plasma CO<sub>2</sub>, bikarbonat og pH og samtidig reduksjon av plasma klorid er vist i tidligere studier med eksponering av laks for høye verdier av CO<sub>2</sub> (Fivelstad et al. 1999; Fivelstad et al. 2013), det er i forsøk også sett økt hematokrit i grupper eksponert for CO<sub>2</sub> (Fivelstad et al. 1999), det ble også funnet i dette prosjektet (Kapittel 3). I prøver fra settefiskanlegg i Midt-Norge fant Klykken et al. (2022) sammenheng mellom nefrokalsinose og høye verdier av plasma kalsium, magnesium, glukose og AST (aspartat aminotransferase), de fant også en økning over tid i plasma kalsium, magnesium og klorid. Stor variasjon i de kjemiske analyseresultatene, at verdier blir påvirket av flere faktorer i fiskens vannmiljø og muligheten for at fisken kan bli påvirket av selve prøveuttakene gjør det vanskelig å tolke disse funnene opp mot hverandre. Resultatene fra feltdata i dette prosjektet viste en tendens til redusert plasma klorid hos fisk med nefrokalsinose, men ingen økning av plasma kalsium. Fisk med HSS hadde tydelig redusert hematokrit, noe som stemmer godt med de observerte blødningene.

En svakhet ved datamaterialet er at analyser av vannprøver burde vært gjennomført grundigere og med bedre kobling til uttak av prøvene fra fisk. Prøvetakingen av vann ble ufullstendig gjennomført i forhold til planen. Vi fikk ikke gode nok serier med prøvetaking av vannkvalitet i alle de fulgte settefiskanleggene, men de uttakene som ble gjort viste alle vannkvalitet innenfor akseptable verdier for både CO<sub>2</sub> (< 15 mg/L) og NH<sub>3</sub>-N (< 12 µg/L) (Vedlegg 3). I de to anleggene der vi fikk bedre prøveserier fant vi ingen tegn til brå endringer eller akkumulering av CO<sub>2</sub> gjennom prøvetakingsperioden. Det ble heller ikke rapportert eller målt høye verdier for salinitet, med unntak av siste uttak på settefisklokalitet B (15,9 ‰). At prevalens og alvorlighetsgrad av både NK og HSS økte fram mot sjøsetting kan likevel indikere at produksjonsintensiteten har en betydning, slik det også ble dokumentert i Forsøk 1 og 2 (Kapittel 3 til 6).

Selv om de registreringene som ble gjort viste en vannkvalitet som var innenfor aksepterte grenseverdier, ble det påvist en gjennomsnittlig prevalens av NK på 35,8 %, med variasjon mellom anleggene fra 8,3 til 64,3 %, og med opphopning av tilfeller i den siste tida før utsett. En stor del av forandringene i nyrevevet (85,2 %) var milde eller moderate, dominert av utfellinger i nyretubuli. Men det ble også funnet mer alvorlige nyreskader, med tubulær nekrose og interstitielle reaktive forandringer i form av betennelse og fibroplasi (arrvevsdannelse). Omfanget av histopatologiske forandringer tyder på at NK påvirker nyrets funksjon og dermed fiskevelferden. Nivået av plasma klorid var nært knyttet til forekomst av NK, som forventet, mens for plasma kalsium og fosfor fant vi ikke den samme økningen som beskrevet av Klykken et al. (2022).

For HSS ble det vist at lidelsen er vanlig forekommende og at det kan være høy prevalens med kliniske funn og dødelighet både i settefiskanlegget og etter utsett. I studien ble det funnet mest HSS hos stor og tydelig smoltifisert fisk. Hos fisk med mild til moderat forekomst av blødninger til nyretubuli var det en tydelig reduksjon i hematokrit og plasma albumin, noe som tyder på at også tidlige stadier av HSS representerer et fysiologisk stress og redusert fiskevelferd. For de mer uttalte tilfellene, der det også blir registrert dødelighet har fisken tydelig anemi og omfattende blødninger i mange organsystemer og situasjonen må beskrives som et hematologisk eller sirkulatorisk kollaps.

Anleggene som var med i studien hadde ulike driftsbetingelser og smoltifiseringsprotokoller. Datagrunnlaget er for øvrig ikke sikkert nok til å trekke konklusjoner om årsaker til forekomst av NK og HSS i disse anleggene. Det var anlegg med gjennomstrømming og med RAS, og både de beste og dårligste resultatene for NK og HSS ble funnet i anlegg av begge typer. Den mest systematiske forskjellen mellom anlegg med høy eller lav prevalens av NK var at alle de tre anleggene med minst NK drev smoltifisering med en protokoll for lysstyring. Fra to av anleggene har vi fått opplyst at de har lagt om driftsprotokollen i forsøk på å redusere problemene. I anlegg D har de etter prosjektet endret tidspunkt for økning av salinitet. I prosjektperioden startet dette etter vaksinerings, i ettertid blir dette startet opp etter testing av fiskens smoltkompetanse tidligere i produksjonen. Målet er å bruke

salinitet til å etablere en god smoltstatus før fisken blir vaksinert. Anlegget mener problemene med NK og HSS er noe redusert, men NK blir fortsatt vurdert som en viktig helseutfordring. I anlegg F har de lagt om til lysstyring, men beholdt bruk av buffere og smoltfôr. Salinitet blir nå økt opp til 15 promille etter at fisken har smoltifisert, mot bare 3 promille tidligere. Problemene med NK og HSS har nesten forsvunnet etter denne omleggingen. Forskjeller i temperatur og bruk av sjøvann kan også ha sammenheng med når skadene oppstår, og med mulige konsekvenser for utviklingen etter utsett i sjø, se også diskusjonen i kap.6.

## **Anbefalinger**

For anlegg som har utfordringer med NK eller HSS er det viktig å finne ut når i produksjonen dette dukker opp, kartlegge hva som skjer i forkant av påvisningene og å utrede hvilke tiltak som kan forebygges eller begrense sykdomsutviklingen i anlegget.

Vi så et godt samsvar mellom makroskopisk skåring av nyre på fisk i settefiskanleggene og den histopatologiske diagnosen for NK. En skåring basert på bare obduksjon og makroskopisk vurdering av nyret vil gi underdiagnostisering av NK-forandringer i tidlig fase eller ved et mildt forløp. For HSS er ikke denne typen makroskopisk vurdering av nyre aktuell, og sykdommen vil ikke vises klinisk før fisken får et anemisk preg og utvikler ascites og synlige blødninger i organer og muskulatur. Ved påvisning av slike forandringer er det også viktig med en grundigere laboratorieundersøkelse for å utelukke alvorlige, listeførte virussykdommer.

Jevnlig uttak av prøver av tverrsnitt av nyrevev til histopatologisk undersøkelse ser ut til å være en god metode for å oppdage og kvantifisere NK og HSS allerede tidlig i sykdomsutviklingen. Histopatologisk vurdering kan gjøres med en enkel gradering slik som i denne studien, eller med mer detaljerte modeller der typen av patologiske forandringer også blir klassifisert. Blodparametere som Hk og plasma albumin kan gi støtteinformasjon om tilstedeværelse av HSS. For fisk med NK var variasjonen i plasmaverdier såpass stor at det er vanskelig å gi noen klar anbefaling om hvordan disse kan brukes til tidlig diagnostikk.

Prosjektet har vist at ved å undersøke tverrsnitt av midtnyre, der det er høy tetthet av nefroner, er det god mulighet til å oppdage tidlige forandringer i glomeruli og tubuli, knyttet til NK og HSS. Snitt lenger fram i nyret vil gi større andel interstitielt og bloddannende vev, snitt lenger bak vil gi flere utførsels ganger og dermed øke muligheten for tidlig diagnose av NK. Pseudobrank kunne ha utfellinger uten at NK ble påvist i nyre, men det var også mange fisk med utfellinger i nyre som ikke hadde utfelling i pseudobrank. Selv om utfellinger i pseudobrank kunne assosieres med NK, er rutinemessig undersøkelse av pseudobrank av usikker verdi for diagnostisering av NK.

Som en samlet anbefaling for kartlegging av NK i settefiskanlegg mener vi det er nødvendig å følge fiskegrupper gjennom hele livsløpet, fra startfôring og til utsett i sjø. En standard plan for å følge faste kar i hver avdeling kan for eksempel bestå i å ta ut månedlige prøver for histologi av normal fisk og å supplere dette med obduksjon, makroskopisk skåring og prøvetaking av svimere og dødfisk. Ved uttak og lagring av prøver tatt med kortere tidsintervall kan man også i ettertid hente opp flere uttak og ha mulighet for en mer nøyaktig tidsangivelse dersom det er nødvendig. En forenklet protokoll med ukentlige samleprøver av nyre fra 10 fisk kan fange opp tidlige forandringer og gi god informasjon om variasjonen over tid. Ved tolking av svar er det viktig å ta med i vurderingen at prøver fra svimere og dødfisk vil kunne gi høyere prevalens enn prøver fra normal fisk. En grundigere kartlegging av normal fisk på bestemte tidspunkter, som ved flytting mellom avdelinger, i tida rundt vaksinerings og rett før utsett kan gi verdifull tilleggsinformasjon om utbredelsen i hele anlegget.



Bruk av en smoltprotokoll med lysstyring kan se ut til å påvirke risikoen for både NK og HSS, men her behøves mer kunnskap om konkret gjennomføring og ikke minst hvordan lysstyringen kombineres med andre produksjons- og miljøforhold, som temperatur, salinitet og bruk av buffere. Det er derfor viktig å gjøre en standardisert loggføring av viktige drifts- og vannkvalitetsparametere, som blant annet temperatur, salinitet, gassbalanse, nitrogenforbindelser, fisketetthet og vannutskifting. For å bruke disse opplysningene må dataene kunne spores til fiskegrupper og kar slik at opplysninger om fiskehelse og data fra overvåkingen av NK og HSS kan analyseres i samme datasett. For vurdering av hvordan disse lidelsene påvirker fiskens velferd og prestasjon i sjøfasen er det også viktig å følge fiskegrupper etter utsett.

### 3 FORSØK 1: FYSIOLOGISKE ENDRINGER HOS ATLANTISK LAKS, FRA FIRE OPPDRETTSANLEGG, EKSPONERT FOR MODERAT FORHØYET CO<sub>2</sub>-NIVÅ UNDER SMOLTIFISERING

---

Av: Camilla Diesen Hosfeld<sup>1</sup>, Sofie Charlotte Remø<sup>3</sup>, Anne Berit Olsen<sup>2</sup>, Per Gunnar Fjellidal<sup>3</sup>, Arve Nilsen<sup>2</sup> og Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>

#### 3.1 INNLEDNING

Nefrokalsinose (NK) er påvist ved høyt alkalitet (Fivelstad et al. 1999 og 2003b), ved lav temperatur (Fivelstad et al. 1999) og ved lav alkalitet (Fivelstad et al. 1998). Ved gjennomgang av arbeidet og erfaringer gjort i tidsrommet 1994-2018 viser det seg at i alle forsøkene der NK ble påvist, kom fisken opprinnelig fra anlegg med intensiv drift, det vil si anlegg med høyt nivå av CO<sub>2</sub>, og forekomsten synes uavhengig av andre forhold. I dette forsøket ble det derfor hentet inn pre-smolt fra både kommersielle (intensive driftsbetingelser/ historie med høy CO<sub>2</sub>) produsenter og en ikke-kommersiell produsent (Matre).

#### Vi ønsket å teste følgende hypotese

At det skjer fysiologiske forandringer i nyre under langvarig eksponering for intensiv drift/høy CO<sub>2</sub> som fører til at smolten er mer sårbar for å utvikle NK ved ytterligere CO<sub>2</sub>-eksponering enn smolt som ikke er oppdrettet under intensiv drift.

I tillegg ønsket vi å teste hypotesen at hemorragisk smolt syndrom (HSS) øker sannsynligheten for NK.

#### 3.2 METODE

##### Forsøksoppsett

Forsøket ble gjennomført på HIs forskningsstasjon på Matre. Fisken som ble brukt i forsøket kom fra fire ulike produksjonsanlegg, tre kommersielle anlegg (med intensive driftsbetingelser) i tillegg til fisk produsert ved Matre forskningsstasjon (ikke-intensive driftsbetingelser). Anleggene blir heretter referert til som anlegg C, A, G og H (*Tabell 3.1.*). Anleggene A og C inngikk i feltstudien i AP1, så forhistorien, med tanke på tilfeller av NK og HSS, samt driftsforholdene som fisken er oppdrettet under er dokumentert i kapittel 2. Opprinnelig skulle det også tas inn fisk fra anlegg D (også fra AP1) til forsøket, men denne ble erstattet av settefisk fra et annet kommersielt anlegg, kalt G.

Etter transport til Matre ble fisken fordelt på 4 glassfibertanker (1x1 m, 400 L). Fisken ble tilvent miljøet i forsøksanlegget (akklimert) over en periode på 2-4 uker. Frem til oppstart av forsøket ble fisken holdt ved lysregime LD 12:12 (vintersignal), før det ble justert til fullt lys (LD 24:0) ved oppstart. Dette ble gjort for å igangsette smoltifiseringen. Fisken ble fôret kontinuerlig når lyset var på, ved bruk av fôrautomater, med en standard diett (Nutra RC, Skretting AS) i henhold til vanntemperatur og produsentens fôringstabell.

Fisken fra de 4 produsentene ble eksponert for 2 ulike vannkvaliteter, høy og lav CO<sub>2</sub>. Dette utgjorde 4 eksponeringsgrupper og 4 kontrollgrupper, en for hver av de ulike anleggene (*Tabell 3.1.*). Forsøket ble gjort i 2 replikaer, altså 16 kar totalt. Saltvann ble brukt som buffer i eksponeringsgruppene for å opprettholde ønsket pH i fiskekarene.

Tabell 3.1. Forsøksoppsett Matre. En gruppe fra hvert anlegg ble eksponert for høyt CO<sub>2</sub>-nivå, mens i kontrollgruppene ble CO<sub>2</sub>-nivå holdt lavt. Hver gruppe består av 2 kar.

	Anlegg C	Anlegg A	Anlegg G	Anlegg H (Matre)
Eksponeringsgrupper:	16 mg/L CO <sub>2</sub>	16 mg/L CO <sub>2</sub>	16 mg/L CO <sub>2</sub>	16 mg/L CO <sub>2</sub>
Kontrollgrupper:	2,5 mg/L CO <sub>2</sub>	2,5 mg/L CO <sub>2</sub>	2,5 mg/L CO <sub>2</sub>	2,5 mg/L CO <sub>2</sub>

Eksponeringsforsøket ble gjennomført under smoltfisering, i en periode på 6 uker, før overføring til sjøvann og videre oppfølging under normale produksjonsbetingelser i en periode på 8 uker. Vannet i fiskekarene holdt 9°C gjennom både ferskvanns (FV)- og saltvannsperioden (SV) av forsøket. Gjennomsnittlig fiskestørrelse fra de ulike produsentene var ulik ved oppstart av forsøket, og antall individer i hver gruppe ble derfor justert for å etterstrebe lik biomasse i alle kar (~8-9 kg/tank; Tabell 3.2.). Forsøket startet opp 10.03.2020 og pågikk til 16.06.2020 i henhold til FOTS #22521.

Tabell 3.2. Fiskens opprinnelse, startvekt (standardavvik), temperatur i leverandøranlegg og type vannbehandling i leverandøranlegget (GS = gjennomstrømming, RAS = resirkulering).

Anlegg	startvekt	Temperatur på anlegg	Type anlegg
C	160 g	12°C	GS/RAS
A	110 g	12,5°C	GS
G	80 g	5°C	GS
H (Matre)	70 g	Naturlig temp FV	GS

\*Henviser til tabell 2.4 for øvrig informasjon om vannkvalitet i anlegg A og C.

## Vannkvalitet

Vannprøver tatt på Matre ble transportert til Høgskulen på Vestlandets laboratorium på Kronstad og analysert samme dag. Det ble brukt gasstette prøveflasker, og pH og total karbonat ble målt med et Thermo Orion instrument koblet til en Ross pH-elektrode og en Thermo Orion CO<sub>2</sub>-elektrode. Vannprøvene ble tempererte i laboratoriet og målingene ble utført ved 21-22 °C. CO<sub>2</sub>-konsentrasjoner ble beregnet fra totalkarbonat-, pH- og likevekttkonstanter ved den temperaturen (9 °C) og saliniteten (1-7 ‰) som var i forsøket.

## Prøvetakning og analyser

Før oppstart av eksperimentet ble fisken individmerket (PIT-tag). Ved oppstart av eksperimentet (dag 0 - 10.03.20) ble 6 fisk fra hver gruppe tatt ut for prøvetakning, totalt 48 fisk. I påfølgende prøvetakninger ble det tatt ut 8 fisk fra hver tank (n=16), totalt 128 fisk, for registrering av vekt og lengde, evaluering av velferd, blod- og vevsprøver (nyre). Individuell vekt og lengde (gaffellengde) ble registrert ved oppstart, midt FV, slutt FV, midt SV og slutt SV. Vekt av hjerte, lever og innvoller ble registrert for beregning av somatisk indeks ved slutten av FV og SV. Gjelleprøver ble analysert med en kommersiell test (smoltvision, Pharmaq analytic), 31.03.20 og 17.04.20, for å fastslå smoltstatus. Oversikt over prøveuttak er vist i Tabell 3.3.

Tabell 3.3. Oversikt over prøveuttak i løpet av eksponeringsperioden.

Dag nr.	Dato	Prøvetatt fisk (n)	Prøver
0 - start FV	10.03.2020	6	Registrering av vekt og lengde, evaluering av velferd, katarakt, blod- og vevsprøver (nyre).
21 - midt FV	31.03.2020	16	Registrering av vekt og lengde, evaluering av velferd, blod- og vevsprøver (nyre), gjelle (smoltstatus)
38 - slutt FV	17.04.2020		Gjelle (smoltstatus)
44 - slutt FV	23.04.2020	16	Registrering av vekt og lengde, evaluering av velferd, katarakt, blod- og vevsprøver (nyre), organvekt
78 - midt SV	27.05.2020	16	Registrering av vekt og lengde, evaluering av velferd, blod- og vevsprøver (nyre)
98 - slutt SV	16.06.2020	16/36	Registrering av vekt og lengde (n=36), evaluering av velferd, katarakt, blod- og vevsprøver (nyre), organvekt (n=16).

To fisk fra hver tank ble avlivet med slag i hodet før blodprøver ble tatt for full analyse i ABL90+ (Gem Premier, Radiometer). Resten av fisken ble bedøvet med tricaine methanesulfonate (FINQUEL MS-222). Prøvene ble tatt fra halevenen med sprøyter tilsatt heparin. Fra blodprøveuttakene i FV ble noe helblod analysert med ABL90 på Matre. Grunnet problemer rundt prøveuttak i perioden med strenge tiltak mot Covid-19, ble de øvrige prøvene fra FV og uttakene i SV ikke analysert på Matre. Blodet fra de resterende prøvene ble sentrifugert før plasma ble overført til eppendorf sentrifugerør og oppbevart på  $-80^{\circ}\text{C}$ , frem til plasma ble analysert med ABL90+ på HVL. Både plasma og helblod ble analysert for ioner ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Ca}^{2+}$ ), pH, partialtrykk av  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ) og metabolitter (glukose, laktat).

pH (Heisler, 1986) og  $P_{\text{CO}_2}$  (Boutilier et al., 1984) ble justert for temperatur ( $\Delta T = 28^{\circ}\text{C}$ ). Nivå av  $\text{HCO}_3^-$  i blod ble beregnet basert på  $P_{\text{CO}_2}$ , pH og  $p_k$  (Boutilier et al., 1984).

Rett etter blodprøvetaking ble del av blodet ble overført til kapillærrør og sentrifugert i 5 min for måling av hematokritt (HK). Antall røde blodceller (RBC) og hemoglobin (Hb) ble bestemt på helblod 24 timer etter blodprøvetaking med Cell-Dyn 400 (Sequoia-Turner Corporation) i henhold til produsentens retningslinjer og Sandnes et al. (1988). Blodprøvene ble oppbevart kaldt ved  $4^{\circ}\text{C}$  frem til analyse. En multielement metode (Julshamn et al. 1999), som tar i bruk ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry), ble benyttet for å analysere på elementer i distalt nyrevev.

Kataraktvurdering ble gjort med en håndholdt Heine HSL 150 spaltelampe (HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Herrsching, Germany) ved oppstart (dag 0), slutt FV (dag 42) og avslutning av forsøket i SV. Hver linse ble gitt en vurdering på skala 0-4, for å angi grad av uklarhet. Summen ble slått sammen slik at hver fisk fikk en vurdering på skalaen 0-8 i henhold til Wall and Bjerkås (1999).

### Uttak av nyre/histopatologi

Baknyren ble tatt ut av samtlige fisk ved hvert prøveuttak. Nyren ble delt på langs, fordelt på prøveglass for histopatologisk undersøkelse. Alvorlighetsgraden av NK ble kategorisert som: NK0 = ikke påvist mineralholdige utfellinger i tubuli eller samlerør, NK1 = mild (utfellinger i 1-5 lumina), NK2 = moderat (6-20), NK3 = alvorlig (21-40) og NK4 = svært alvorlig ( $> 40$ ) (Fivelstad et al. 2018; Rodger & Richards, 1998).

## Beregninger

Beregninger for evaluering av vekst:

$$\text{Kondisjonsfaktor (K-faktor)} = \text{vekt (g)} / \text{lengde}^3(\text{cm}) * 100$$

$$\text{Spesifikk vekstrate (SGR)} = (\ln \text{vekt2(g)} - \ln \text{vekt1(g)}) / \text{antall dager} * 100$$

Beregninger av relativ organvekt for hjerte, lever og innmat:

$$\text{Kardio-somatisk indeks (CSI)} = (\text{vekt hjerte (g)} / \text{vekt fisk (g)}) * 1000$$

$$\text{Hepato-somatisk indeks (HSI)} = (\text{vekt lever (g)} / \text{vekt fisk (g)}) * 100$$

$$\text{Visceral-somatisk indeks (VSI)} = (\text{vekt viscera (g)} / \text{vekt fisk (g)}) * 100$$

## 3.3 RESULTAT

### Vannkvalitet

Tabell 3.4. Gjennomsnittsverdier for CO<sub>2</sub>, salinitet og temperatur, samt pH-intervall, i eksponerings- (H) og kontrollgruppene (L) gjennom ferskvannsfasen av forsøksperioden. Oksygenmetning ble holdt over 80 % i alle avløp i hele forsøksperioden.

	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> [mg/L]	pH	Salinitet [‰]	Temp [°C]
anlegg C	H	15,5	6,18-6,59	5-7	8,6
	L	2,6	6,29-6,50	0,7-1,3	9,3
anlegg A	H	15,9	6,10-6,47	5-7	8,8
	L	2,5	6,37-6,51	0,7-1,3	9,2
anlegg G	H	15,5	6,20-6,53	5-7	8,8
	L	2,8	6,39*	0,7-1,3	9,2
anlegg H	H	16,3	6,11-6,47	5-7	8,8
	L	2,5	5,75-6,46	0,7-1,3	9,1

\*enkeltmåling

### Histopatologi - Forekomst av NK i ferskvann

Som vist i Tabell 3.5. ble det ved 0-uttaket (start FV) påvist NK hos 10.4 % av fisken og blødning til tubuli hos 6.3 % av fisken. Ved midt og sluttuttaket i FV var det svært begrensede funn av NK og blødning til tubuli. Det ble i all hovedsak registrert milde funn og begge diagnosene ble påvist i både eksponerings (H) og kontrollgrupper (L). Det ble ikke ved noen av uttakene registrert samtidig funn av NK og blødning til tubuli. Ved sluttuttak i sjø ble det ikke påvist funn av NK, og kun hos en fisk ble det registrert blødning, og da bare til noen få tubuli.

Etter overføring av fisk fra anlegg A og C fortsatte vi å analysere nyreprøver fra de kommersielle anleggene fram til sjøsetting (Se kapittel 2). Parallelt med forsøket der vi ikke fikk noen økning i nyreskader, verken utfellinger eller blødninger, så vi i disse to kommersielle anleggene en markert økning i både NK og HSS i ukene fram mot sjøsetting.

Tabell 3.5. Prevalens av nefrokalsinose (NK) i eksponeringsgrupper (H:1-4) og kontrollgrupper (L:5-8) ved tre prøveuttak (0-uttak, midt FV og slutt FV). Skåring av histopatologiske forandringer i tubuli og samlerør: 0 = ikke påvist, 1 = mild, 1 – 5 affiserte, 2 = moderat, 6 – 20.

	Gruppe	CO2	Nefrokalsinose			CO2	Blødning til tubuli		
			Uttak 0	Uttak midt fv.	Uttak slutt fv.		Uttak 0	Uttak midt fv.	Uttak slutt fv.
			10.03.2020	31.03.2020	23.04.2020		11.03.2020	31.03.2020	23.04.2020
Anlegg C	5	L		1	0	L	0	0	0
	1	H	1*	1	1	H	0	0	1
Anlegg A	6	L		0	0	L	0	0	0
	2	H	3	0	1	H	0	1	1^
Anlegg G	7	L		0	0	L	2	0	0
	3	H	0	0	0	H	0	0	0
Anlegg H	8	L		0	0	L		0	2
	4	H	1	0	0	H	1	0	2
Antall undersøkt			48	128	128		48	128	128
Kommentar			*Uttalte funn	Milde funn	Milde funn		Milde funn	Milde funn	^Moderate funn
			Øvrige:Milde				Øvrige: Milde		

## Vekst og dødelighet

Fisken hadde i utgangspunktet ulik snittvekt ettersom fisk fra anlegg C var mer enn dobbelt så stor som fisk fra anlegg H (Tabell 3.2.). Det var en generell tendens til at fisk i kontrollgruppene hadde noe bedre tilvekst (SGR, Tabell 3.6.) enn fisk fra samme anlegg som ble eksponert for CO<sub>2</sub>. Dette var tilfelle for fisk fra anleggene A, G og H for SV perioden og for fisk fra anlegg C i FV perioden. Det ble ikke observert noen dødelighet i forsøket. Ved avslutning av ferskvannsfasen var CSI signifikant forhøyet i eksponeringsgruppene for anlegg C og H (H) sammenliknet med sine respektive kontrollgrupper (L). For de øvrige somatiske indeksene (HSI og VSI) var det ikke noe signifikant avvik mellom eksponeringsgruppe og tilhørende kontrollgruppe for uttak ved slutt FV og SV (Tabell 3.8.).

Tabell 3.6. SGR for kontroll (L) og eksponeringsgruppene (H), beregnet for tiden i ferskvann (FV), sjøvann (SV) og for hele forsøksperioden (TOT)

SGR	CO <sub>2</sub>	FV	SV	TOT
anlegg C	H	0,50	1,08	0,83
	L	0,76	0,84	0,81
anlegg A	H	0,44	0,88	0,69
	L	0,33	1,06	0,75
anlegg G	H	0,92	1,12	1,03
	L	0,92	1,29	1,13
anlegg H	H	0,83	0,85	0,84
	L	0,83	0,98	0,91

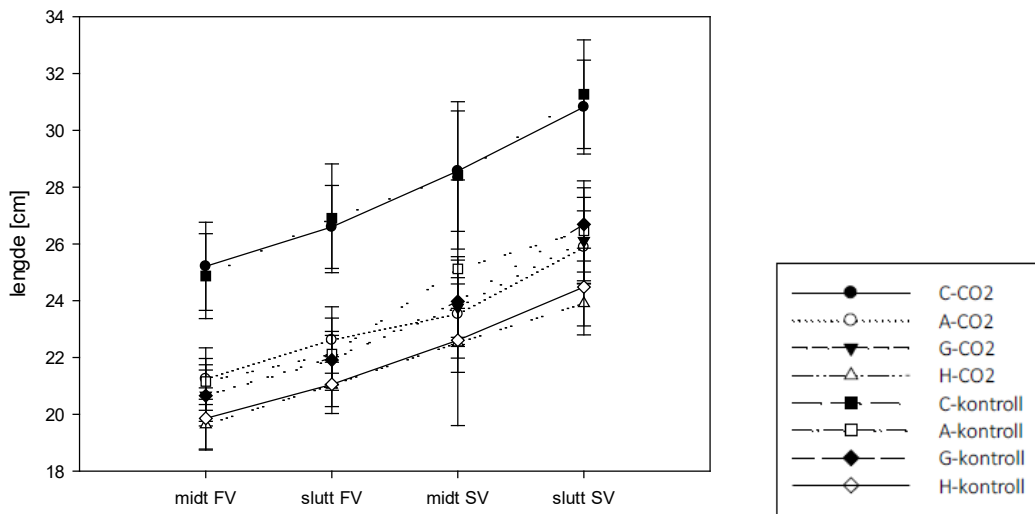
Tabell 3.7. Gjennomsnittsverdier for k-faktor  $\pm$  SD beregnet for kontroll (L) og eksponeringsgruppene (H), ved uttak dag 21 (midt ferskvann, n =16), dag 44 (slutt ferskvann, n= 16), dag 78 (midt sjøvann, n=16) og dag 98 (slutt sjøvann, n=36). Ulik bokstav i samme kolonne indikerer signifikant forskjell.

		k-faktor											
		CO2	midt FV		slutt FV		midt SV		slutt SV				
anlegg C	H	1,04	$\pm$	0,07 a	1,04	$\pm$	0,08 a	1,18	$\pm$	0,12 ab	1,21	$\pm$	0,04 bc
	L	1,07	$\pm$	0,08 ab	1,11	$\pm$	0,15 bc	1,39	$\pm$	0,63 c	1,18	$\pm$	0,05 b
anlegg A	H	1,20	$\pm$	0,07 e	1,14	$\pm$	0,06 c	1,23	$\pm$	0,08 bc	1,25	$\pm$	0,04 d
	L	1,21	$\pm$	0,05 e	1,16	$\pm$	0,05 c	1,18	$\pm$	0,19 ab	1,24	$\pm$	0,05 cd
anlegg G	H	1,11	$\pm$	0,05 cd	1,11	$\pm$	0,05 bc	1,20	$\pm$	0,07 ab	1,21	$\pm$	0,04 bc
	L	1,15	$\pm$	0,04d	1,12	$\pm$	0,05 c	1,19	$\pm$	0,08 ab	1,22	$\pm$	0,08 cd
anlegg H	H	1,10	$\pm$	0,05 bc	1,06	$\pm$	0,05 ab	1,04	$\pm$	0,20 a	1,12	$\pm$	0,06 a
	L	1,11	$\pm$	0,05cd	1,06	$\pm$	0,06 ac	1,12	$\pm$	0,07 ab	1,13	$\pm$	0,04 a

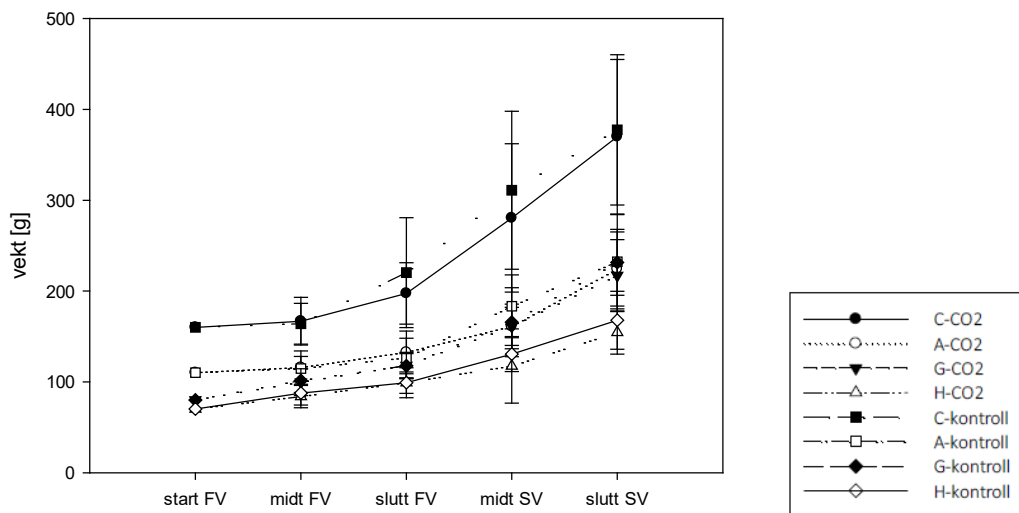
Tabell 3.8. Gjennomsnittlig somatisk indeks  $\pm$  SD for hjerte (CSI), lever (HSI) og innmat (VSI) for kontroll (L) og eksponeringsgruppene (H) ved uttakene slutt FV (dag 44) og slutt SV (dag 98). Ulik bokstav i samme kolonne indikerer signifikant forskjell.

		CSI [n=16]			HCl (n=16)			VSI (n =16)											
		CO2	slutt FV		slutt SV		slutt FV		slutt SV										
anlegg C	H	2,1	$\pm$	0,21 f	1,9	$\pm$	0,37 c	1,0	$\pm$	0,21 b	1,1	$\pm$	0,10 d	7,3	$\pm$	0,67 c	8,6	$\pm$	0,60 d
	L	2,0	$\pm$	0,29 e	1,8	$\pm$	0,15 c	0,9	$\pm$	0,13 b	1,1	$\pm$	0,08 cd	7,3	$\pm$	1,09 c	8,2	$\pm$	0,74 d
anlegg A	H	1,6	$\pm$	0,15 ab	1,6	$\pm$	0,20 ab	0,7	$\pm$	0,07 a	1,0	$\pm$	0,16 bcd	5,3	$\pm$	0,57 a	6,6	$\pm$	0,71 a
	L	1,6	$\pm$	0,15 a	1,5	$\pm$	0,15 a	0,7	$\pm$	0,08 a	1,0	$\pm$	0,11 ab	5,4	$\pm$	0,58 a	6,6	$\pm$	0,81 a
anlegg G	H	1,8	$\pm$	0,18 cde	1,6	$\pm$	0,15 ab	0,8	$\pm$	0,06 a	1,0	$\pm$	0,09 abc	6,4	$\pm$	0,48 b	7,3	$\pm$	0,67 bc
	L	1,8	$\pm$	0,17 bcd	1,5	$\pm$	0,12 a	0,8	$\pm$	0,05 a	1,0	$\pm$	0,06 a	6,4	$\pm$	0,48 b	7,4	$\pm$	0,67 c
anlegg H	H	1,9	$\pm$	0,15 de	1,7	$\pm$	0,29 bc	0,7	$\pm$	0,08 a	1,1	$\pm$	0,14 d	6,2	$\pm$	0,64 b	7,1	$\pm$	1,06 abc
	L	1,7	$\pm$	0,13 abc	1,6	$\pm$	0,21 ab	0,8	$\pm$	0,10 a	1,0	$\pm$	0,14 bcd	6,6	$\pm$	0,43 b	6,7	$\pm$	0,62 ab

Ved avslutning i FV (dag 44) var vekt (Figur 3.2.) og k-faktor (Tabell 3.7.) i eksponeringsgruppen for anlegg C (H) signifikant lavere enn i tilhørende kontrollgruppe (L). Tilsvarende forskjell ble ikke funnet for noen av de andre anleggsgruppene ved noen av de øvrige prøveuttakene. Ved midtuttaket i SV var fremdeles k-faktor i eksponeringsgruppen for anlegg C (H) signifikant lavere enn for den tilhørende kontrollgruppen (L) (Tabell 3.7.). Ved midtuttaket i SV var lengden i eksponeringsgruppen for anlegg A signifikant lavere enn for den tilhørende kontrollgruppen (Figur 3.1.). Ved avslutning i SV var det ikke noen signifikant forskjell på vekstparametere mellom noen av eksponeringsgruppene og deres respektive kontrollgrupper.



Figur 3.1. Gjennomsnittlig lengde  $\pm$  SD for de ulike gruppene ved prøveuttak dag 0, 21, 44, 78 og 98. Eksponeringsgruppene (H) er C-CO<sub>2</sub>, A-CO<sub>2</sub>, G-CO<sub>2</sub> og H-CO<sub>2</sub>. Mens tilhørende kontrollgrupper (L) er C-kontroll, A-kontroll, G-kontroll og H-kontroll.



Figur 3.2. Gjennomsnittlig vekt  $\pm$  SD for de ulike gruppene ved prøveuttak dag 0, 21, 44, 78 og 98. Eksponeringsgruppene (H) er C-CO<sub>2</sub>, A-CO<sub>2</sub>, G-CO<sub>2</sub> og H-CO<sub>2</sub>. Mens tilhørende kontrollgrupper (L) er C-kontroll, A-kontroll, G-kontroll og H-kontroll.

### Blodparametere

Grunnet pandemien og påfølgende restriksjoner i personelltilgang, ble kun et utvalg av blodprøvene analysert på helblod, mens de øvrige ble lagret som plasma og analysert på et senere tidspunkt. På grunn av store avvik i samtlige blodparametere mellom helblod og plasma, er det her kun presentert resultater fra målingene gjort på helblod (start FV, midt FV og slutt FV).

Ved oppstart i FV (dag 0) ble det observert at PCO<sub>2</sub> var signifikant lavere, og blod pH var signifikant høyere, i eksponeringsgruppen til anlegg C (H) sammenliknet med tilhørende kontrollgruppe (L) (Figur



3.3. og 3.4.). For  $\text{HCO}_3^-$  var det ingen signifikant forskjell mellom gruppene ved dette uttaket (*Figur 3.35.*).

Ved midtuttaket var pH i blod i eksponeringsgruppene (H) for anlegg G og H signifikant høyere enn i de tilhørende kontrollgruppene (L) (*Figur 3.4.*). Ved sluttuttaket i FV var pH i blod i eksponeringsgruppene (H) for anlegg G og A signifikant høyere enn i de tilhørende kontrollgruppene (L) (*Figur 3.34.*). For blodparameterne  $\text{P}_{\text{CO}_2}$  og  $\text{HCO}_3^-$  var nivåene i samtlige  $\text{CO}_2$ -grupper (H) signifikant høyere enn i de respektive kontrollgruppene (L) for både midt og slutt-uttaket i ferskvannsperioden.

Når det kommer til øvrige blodparametere var effekten av  $\text{CO}_2$ -eksponering ikke like tydelig i løpet av ferskvannsfasen (*Tabell 3.9.*). Ved oppstart av FV (dag 0) var nivået av  $\text{K}^+$  signifikant lavere i eksponeringsgruppen for anlegg C sammenliknet med kontrollgruppen. Det var ingen signifikante avvik mellom eksponeringsgrupper (H) og tilhørende kontrollgrupper (L) for nivåene av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  målt i blodet ved oppstart av forsøket (dag 0). For HCT var det kun eksponeringsgruppen for anlegg C som var signifikant lavere enn sin kontrollgruppe.

Ved midtuttaket i FV (dag 21) var det ingen signifikant forskjell mellom eksponeringsgrupper (H) og de tilhørende kontrollgruppene (L) for parameterne  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  og  $\text{Ca}^{2+}$ . For  $\text{Cl}^-$  var nivået i samtlige eksponeringsgrupper signifikant lavere enn i tilhørende kontrollgrupper (*Tabell 3.9.*). Nivåene av glukose var signifikant redusert i samtlige eksponeringsgrupper (H) sammenliknet med tilhørende kontrollgruppe (L) (*Tabell 3.9.*).

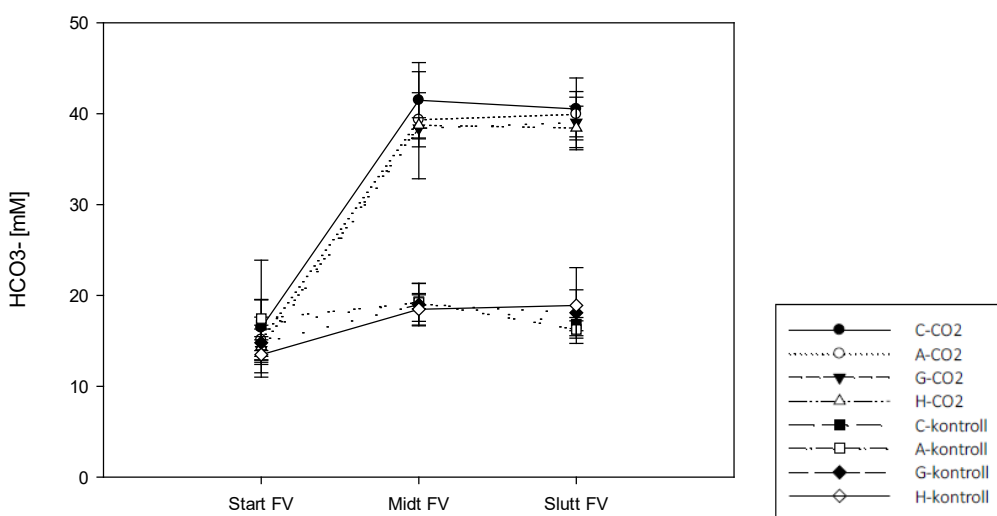
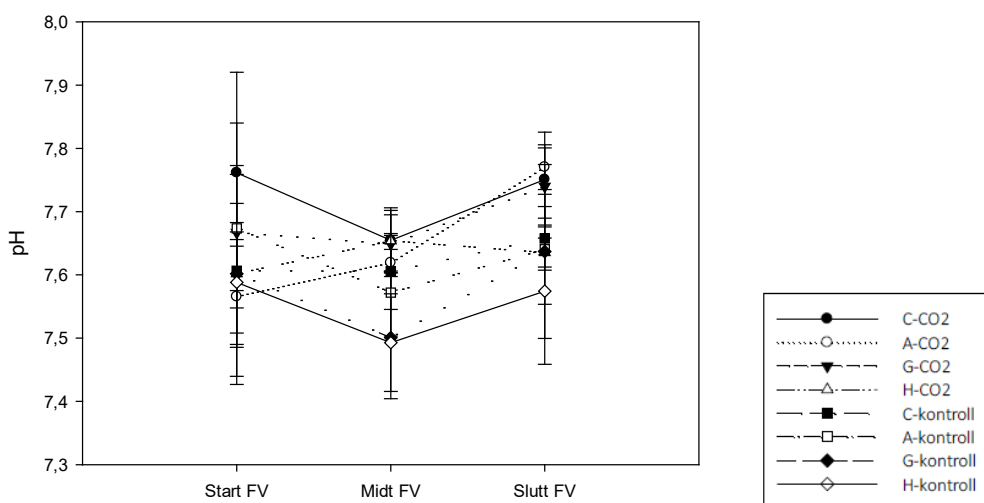
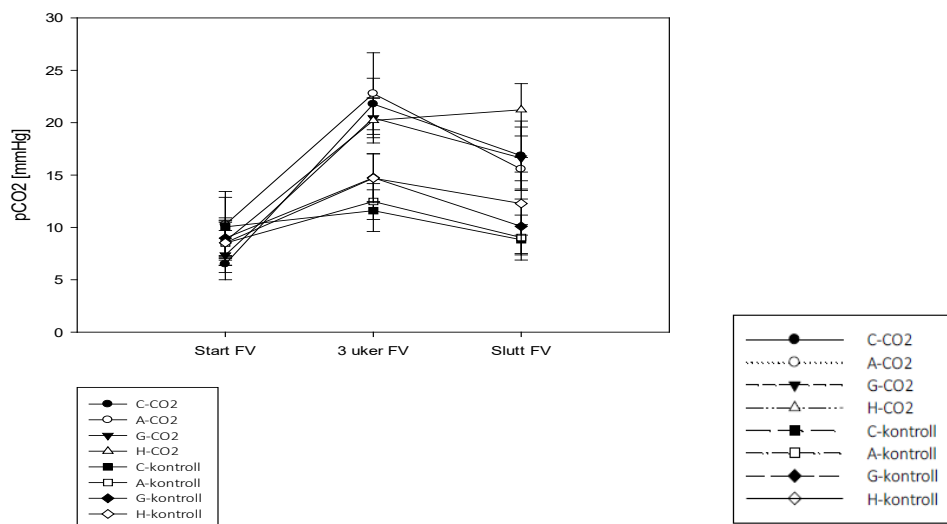
Ved sluttuttaket i FV (dag 44) var nivået av  $\text{K}^+$  i eksponeringsgruppen for anlegg H signifikant høyere enn i kontrollgruppen. For de øvrige gruppene var det ikke signifikant forskjell mellom eksponering og kontroll for denne parameteren (*Tabell 3.9.*). For  $\text{Na}^+$  var nivået signifikant høyere i eksponeringsgruppen for anlegg G sammenliknet med kontrollgruppen. I eksponeringsgruppen (H) for anlegg C var nivået av  $\text{Ca}^{2+}$  signifikant lavere enn i den tilhørende kontrollgruppen (L). For blodparameteren  $\text{Cl}^-$  var nivået signifikant lavere i eksponeringsgruppene (H) for anleggene A, C og G sammenliknet med tilhørende kontrollgrupper (L) ved dag 44 (*Tabell 3.9.*). Nivåene av glukose var signifikant redusert i eksponeringsgruppene for anlegg C, G og H sammenliknet med sine respektive kontrollgrupper (*Tabell 3.9.*). Når det gjelder HCT-nivå var det kun eksponeringsgruppen for anlegg C som var signifikant lavere enn sin kontrollgruppe.

### **Katarakt**

Det ble ikke observert noe katarakt hos fisken som følge av  $\text{CO}_2$ -eksponeringen, hverken i FV eller SV.

Tabell 3.9. Gjennomsnittsverdier ( $\pm$ SD) for blodparametere ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  og glukose i  $mM L^{-1}$ ) analysert på helblod vha ABL90+ fra tre uttak i FV perioden (Start, midt og slutt) i eksponerings- (H) og kontrollgruppene (L). Hematokritt (HCT) fra start FV, slutt FV og slutt SV er også presentert. Ulik bokstav på samme rekke viser signifikant avvik. n viser antall prøver.

	anlegg C				anlegg A				anlegg G				anlegg H			
	H		L		H		L		H		L		H		L	
$K^+$	n		n		n		n		n		n		n			
Start FV	5	3,7 $\pm$ 0,27 a	4	5,0 $\pm$ 0,51 b	5	3,7 $\pm$ 0,27 ab	2	4,4 $\pm$ 0,99 ab	4	4,3 $\pm$ 1,16 ab	4	4,9 $\pm$ 0,88 ab	5	4,9 $\pm$ 1,54 b	6	4,7 $\pm$ 0,82 ab
Midt FV	6	4,02 $\pm$ 0,63 a	6	4,4 $\pm$ 0,47 ab	6	4,2 $\pm$ 0,63 ab	6	4,9 $\pm$ 1,56 ab	6	5,4 $\pm$ 0,48 b	6	4,2 $\pm$ 0,50 ab	5	4,2 $\pm$ 1,79 ab	6	5,1 $\pm$ 1,24 ab
Slutt FV	7	4,7 $\pm$ 0,67 a	6	5,4 $\pm$ 0,89 abc	6	5,3 $\pm$ 0,81 abc	7	4,8 $\pm$ 0,97 ab	7	5,0 $\pm$ 0,66 abc	6	5,8 $\pm$ 1,58 bcd	3	7,0 $\pm$ 0,21 d	7	5,9 $\pm$ 1,20 bc
$Cl^-$																
Start FV	3	136,2 $\pm$ 4,58 ab	3	139,7 $\pm$ 2,87 b	5	141 $\pm$ 1,22 ab	1	134,0 $\pm$ 0,0 ab	4	139,5 $\pm$ 2,08 ab	4	134,8 $\pm$ 5,62 ab	5	132,2 $\pm$ 8,25 a	6	135,2 $\pm$ 10,8 ab
Midt FV	6	129,8 $\pm$ 1,33 b	6	138,8 $\pm$ 1,94 c	6	129,5 $\pm$ 2,43 b	6	139 $\pm$ 2,37 c	6	128,7 $\pm$ 3,67 b	6	138,2 $\pm$ 2,93 c	5	123,8 $\pm$ 4,76 a	6	136 $\pm$ 4,29 c
Slutt FV	7	126,3 $\pm$ 3,59 a	6	136,5 $\pm$ 3,51 b	6	124,7 $\pm$ 2,94 a	7	137 $\pm$ 5,20 b	7	125,9 $\pm$ 5,34 a	6	136,7 $\pm$ 3,72 b	3	123 $\pm$ 2,65 a	7	128 $\pm$ 12,94 a
$Ca^{2+}$																
Start FV	5	0,9 $\pm$ 0,48	4	1,1 $\pm$ 0,26	5	1,2 $\pm$ 0,07	2	0,7 $\pm$ 0,21	4	1,1 $\pm$ 0,13	4	0,8 $\pm$ 0,32	5	0,7 $\pm$ 0,48	6	0,9 $\pm$ 0,48
Midt FV	6	1,3 $\pm$ 0,28 c	6	1,3 $\pm$ 0,23 c	6	1,3 $\pm$ 0,14 c	6	1,1 $\pm$ 0,35 acb	6	1,2 $\pm$ 0,38 bc	6	0,9 $\pm$ 0,39 ab	5	0,8 $\pm$ 0,40 a	6	0,9 $\pm$ 0,36 ab
Slutt FV	7	0,8 $\pm$ 0,38 ab	6	1,2 $\pm$ 0,21 c	6	0,9 $\pm$ 0,33 abc	7	1,0 $\pm$ 0,30 abc	7	1,0 $\pm$ 0,37 abc	6	1,1 $\pm$ 0,20 bc	3	0,8 $\pm$ 0,24 abc	7	0,7 $\pm$ 0,40 a
$Na^+$																
Start FV	3	154 $\pm$ 4,93 a	3	159,0 $\pm$ 3,87 ab	5	163,4 $\pm$ 2,70 b	1	161 $\pm$ 0,0 ab	4	161 $\pm$ 1,41 b	4	159,3 $\pm$ 4,27 ab	5	159 $\pm$ 3,87 ab	6	160,3 $\pm$ 4,32 b
Midt FV	6	160,2 $\pm$ 2,32 a	6	160,2 $\pm$ 2,22 a	6	164,8 $\pm$ 3,76 b	6	163 $\pm$ 5,01 ab	6	160,8 $\pm$ 3,65 ab	6	163,5 $\pm$ 5,00 ab	5	163,4 $\pm$ 1,67 ab	6	161,7 $\pm$ 3,61 ab
Slutt FV	7	157 $\pm$ 3,27 ab	6	156,5 $\pm$ 3,78 ab	6	158 $\pm$ 2,37 ab	7	157,9 $\pm$ 3,02 ab	7	159,4 $\pm$ 1,90 b	6	156 $\pm$ 2,52 a	3	157 $\pm$ 1,0ab	7	158,6 $\pm$ 3,46 ab
Glukose																
Start FV	2	4,35 $\pm$ 1,48	2	3,6 $\pm$ 0,14	3	4,17 $\pm$ 0,71	0		3	3,9 $\pm$ 0,17	4	3,98 $\pm$ 0,68	5	3,32 $\pm$ 0,49	4	3,68 $\pm$ 0,79
Midt FV	5	4,02 $\pm$ 0,52 a	5	4,82 $\pm$ 0,23 b	5	4,84 $\pm$ 0,38 b	4	6,1 $\pm$ 0,36 de	6	5,33 $\pm$ 0,33 c	3	6,33 $\pm$ 0,15 e	5	4,82 $\pm$ 0,44 b	4	5,6 $\pm$ 0,56 cd
Slutt FV	6	4,18 $\pm$ 0,52 a	6	4,98 $\pm$ 0,35 cd	6	4,75 $\pm$ 0,24 bcd	7	5,02 $\pm$ 0,40 cd	7	4,73 $\pm$ 0,47 bc	6	5,27 $\pm$ 0,69 d	3	4,3 $\pm$ 0,3 ab	7	4,97 $\pm$ 0,67 cd
HCT																
Start FV	5	29,6 $\pm$ 2,79 a	4	37,8 $\pm$ 3,59 b	5	32,6 $\pm$ 4,83 ab	2	37 $\pm$ 1,41 b	4	29,8 $\pm$ 0,96 a	4	33,8 $\pm$ 0,96 ab	5	36 $\pm$ 7,68 b	6	34,2 $\pm$ 1,60 ab
Slutt FV	6	32,5 $\pm$ 6,89 a	6	39,8 $\pm$ 3,66 b	6	38,7 $\pm$ 3,88 ab	6	38,7 $\pm$ 7,15 ab	6	38,8 $\pm$ 5,88 ab	5	38,2 $\pm$ 4,60 ab	3	33 $\pm$ 4,36 ab	6	39,3 $\pm$ 5,20 b
Slutt SV	3	37 $\pm$ 3,46 bcd	6	35,8 $\pm$ 1,47 bc	6	37,5 $\pm$ 2,81 bc	6	34,7 $\pm$ 4,68 ab	6	41,8 $\pm$ 2,23 d	6	38 $\pm$ 1,79 bcd	6	38,8 $\pm$ 2,48 cd	6	31,3 $\pm$ 5,92 a



Figur 3.3, 3.4, og 3.5. Viser hhv  $P_{CO_2}$  (mmHg) og pH verdier målt i helblod og justert for temperatur, samt beregnet  $HCO_3^-$  (mM), gjennom ferskvannsprøvetiden. Symbolforklaringen og linjetype er det samme for alle figurene. Eksponeringsgruppene (H) er C-CO<sub>2</sub>, A-CO<sub>2</sub>, G-CO<sub>2</sub> og H-CO<sub>2</sub>. Mens tilhørende kontrollgrupper (L) er C-kontroll, A-kontroll, G-kontroll og H-kontroll.

### 3.4 DISKUSJON

Observasjoner av NK i norsk oppdrettslaks er blitt rapportert i økende grad i både ferskvann og brakkvann (Sommerset et al. 2023), og ifølge den årlige fiskehelse rapporten blir det vurdert til å være en viktig velferdsutfordring i de senere år. I samme periode har det skjedd en intensivering av produksjonsmetoder i landbasert oppdrett. Utfordringer knyttet til sykdom, lus og miljøpåvirkning har ført til at norske oppdrettere i stadig større grad har tatt i bruk nye produksjonsstrategier. Dette inkluderer blant annet lengre produksjonstid på land, gjennom produksjon av stor smolt og post smolt, noe som fører til en økning i biomasse. Resultatet er et økt vannbehov som dekkes gjennom økt grad av resirkulering, redusert vannforbruk og ofte bruk av brakkvann. Disse nye produksjonsstrategiene er i større grad enn tradisjonelle oppdrettsmetoder assosiert med redusert spesifikk vanngjennomstrømming, kortere produksjonssyklus og ofte redusert vannkvalitet (Calabrese 2017). I intensivt oppdrett av både laks og ørret er NK en kjent utfordring (Smart et al. 1979, Fivelstad et al. 1999, 2003 og 2018, Minarova et al. 2023). NK regnes som en multifaktoriell produksjonsslidelse, og bl.a. høye nivå av CO<sub>2</sub> lenge vært ansett som en viktig årsak til utfelling av nyrestein hos fisk i oppdrett (Smart et al. 1979, Fivelstad et al. 2003, 2013 og 2018, Skov 2019, Minarova et al. 2023). Fisken ble i dette forsøket eksponert for moderat høy CO<sub>2</sub> (~16 mg/L). Dette er noe i overkant av det som er definert som trygge nivåer for settefisk (Fivelstad et al., 2013), men samtidig et nivå som hvor det tidligere har blitt observert økt mineralomsetning og utvikling av NK (Fivelstad et al., 2003b). I kontrollgruppene var nivået rundt 2,5 mg/L.

Resultater fra blodanalysene viser at moderat hyperkapni (økt nivå av CO<sub>2</sub>) førte til noen endringer i blodkjemi. Både P<sub>CO<sub>2</sub></sub> og HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> var signifikant forhøyet i samtlige eksponeringsgrupper ved både midt og sluttuttaket i FV. Det ble også observert effekt på pH i blod, ettersom denne var signifikant forhøyet i enkelte av eksponeringsgruppene sammenliknet med kontrollgruppene ved midt og sluttuttaket. Dette samsvarer med det vi vet om fiskens kompensatoriske syre-base regulering (Gilmour & Perry 2009). Når partialtrykket av CO<sub>2</sub> øker i vannet som følge av CO<sub>2</sub>-tilsetningen vil det resultere i økt P<sub>CO<sub>2</sub></sub> i fiskens blod, som igjen forårsaker en forbigående respiratorisk acidose og fall i blodets pH (Perry & Gilmore 2006, Minarova et al. 2023). Som en kompensasjonsmekanisme vil fisken bufre syreoverskuddet ved å øke nivået av HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> i plasma (Heisler 1986) og H<sup>+</sup> skilles aktivt ut over gjellene i bytte mot Na<sup>+</sup> (Evans et al. 2005). Som et ledd i ionebalansen vil oppreguleringen av HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> føre til reduksjon av Cl<sup>-</sup> (Fivelstad et al. 2003a), noe som også ble observert i dette forsøket. For alle grupper utenom eksponeringsgruppen for anlegg H ble P<sub>CO<sub>2</sub></sub> noe redusert fra midtuttaket i FV til sluttuttaket i FV. Bikarbonatnivået forble høyt og Cl<sup>-</sup> nivået forble lavt i alle eksponeringsgrupper også ved avslutning i FV. Fisken syntes altså i stand til å opprettholde homeostase gjennom de beskrevne kompensasjonsmekanismene ved eksponering for CO<sub>2</sub> opptil 16 mg/L gjennom smoltifiseringen. Eksponering for sub-optimal vannkvalitet kan altså medføre energikrevende fysiologiske tilpasninger hos fisk, og nivå av plasma glukose kan derfor benyttes som indikator på stressrespons (Noble et al. 2018). Tidligere studier har rapportert at nivåer av plasma glukose hos Atlantisk laks ikke blir signifikant påvirket av CO<sub>2</sub>-eksponering (Calabrese et al. 2023; Hosfeld et al. 2008, Mota et al. 2020). Men, i dette forsøket ble det funnet signifikant redusert plasma glukose hos fisk i de eksponerte gruppene (H) sammenliknet med sine respektive kontrollgrupper (L) ved både midt- (anlegg A, C, G og H) og slutt-uttaket (anlegg A, G og H) i FV. Dette samsvarer med en studie av Good et al. (2018), hvor det ble observert signifikant redusert plasma glukose i eksponeringsgruppene sammenliknet med fisk i kontrollgruppen, hos postsmolt i RAS eksponert for 20 mg L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> over en periode på vel ett år. Good et al. (2018) foreslo at fisk fra kontrollgruppen, uten CO<sub>2</sub>-eksponering, var mer mottakelig for håndteringstress ved prøvetakning, noe som ledet til at det ble frigitt mer katekolamin som igjen førte til økt nivå av plasma glukose. Det er verdt å nevne at plasma glukose ikke alltid blir regnet som en god indikator for stressrespons hos fisk ettersom denne parameteren kan bli påvirket av en rekke ulike faktorer (Mommsen et al. 1999; Noble et al. 2018).

Det er vanlig å benytte kalsiumbufferer for å regulere pH i produksjonsvannet. En annen mulighet er å benytte sjøvann slik det ble gjort i dette forsøket. Hvordan brakkvann benyttes i produksjon varierer,

både med tanke på tidspunkt og grad av salinitet. Ved tilsats av sjøvann før fisken har utviklet sjøvannstoleranse kan det føre til velferdsutfordringer som osmotisk stress og potensielt utfellinger av mineraler i nyrene (Dalum, 2019). I dette forsøket ble sjøvannet blandet inn i produksjonsvannet for eksponeringsgruppene slik at saliniteten lå i området 5-7 ‰. Klykken et al. (2022) observerte en økning i andel smolt med NK i oppdrett ved bruk av brakkvann fra januar til februar. Noe liknende ble ikke observert i dette forsøket.

Reduksjon i vekst og k-faktor er et typisk funn i forsøk med CO<sub>2</sub> eksponering som følge av økt energiforbruk, redusert appetitt og redusert oksygenopptak (Good et al., 2018; Fivelstad et al. 1998, 1999a, 2003a og 2003b). I dette forsøket ble denne effekten kun observert i eksponeringsgruppen for anlegg C ved slutten av ferskvannsprøven, hvor vekt og k-faktor var signifikant redusert sammenliknet med kontroll. Fisk fra anlegg C var den med størst gjennomsnittlig individvekt ved starten av forsøket (for mer informasjon om driftsforhold og observasjoner fra anlegg C henvises til kapittel 2).

Ved oppstart av forsøket ble det registrert NK hos 10,4 % av fisken og blødning til tubuli hos 6,3 %. Funnet av NK ved oppstart var kun i fisk fra anlegg A og C og kun i ferskvannsprøven. Det ble i hovedsak registrert milde funn, og funnene var ikke begrenset til eksponeringsgruppene (H). Det ble derfor ikke funnet noen årsakssammenheng mellom moderat CO<sub>2</sub>-eksponering av fisk fra intensive anlegg og forekomst av NK. Derimot kan observasjonene i dette forsøket tolkes som en tilfriskning. Parallelt med dette forsøket, ble det fortsatt analysert nyreprøver fra to av de kommersielle anleggene (A og C), hvor det interessant nok ble observert en markert økning i både NK og HSS i ukene fram mot sjøsetting.

## 4 FORSØK 2: NEFROKALSINOSE UNDER SMOLTIFISERING HOS ATLANTISK LAKS (*SALMO SALAR*L) EKSPONERT FOR HYPERKAPNI (HØY CO<sub>2</sub>) OG EN KOMBINASJON AV HYPERKAPNI OG HYPEROKSI (HØY CO<sub>2</sub> OG HØY O<sub>2</sub>)

---

Av: Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>, Camilla Diesen Hosfeld<sup>1</sup>, Ingunn Sommerset<sup>2</sup>, Arve Nilsen<sup>2</sup>, Sofie Charlotte Remø<sup>3</sup>, Ian Mayer,<sup>5</sup> Kamilla Barstad<sup>1</sup>, Margrete Rommetveit Fivelstad<sup>1</sup>, Magnus Elgmork<sup>1</sup> og Anne Berit Olsen<sup>2</sup>

### 4.1 INNLEDNING

I settefiskfasen kan laksen være utsatt for økte verdier av karbondioksid (CO<sub>2</sub>) i store deler av livssyklusen, og fiskens indre miljø er forskjellig fra det indre miljøet hos fisk som svømmer i vann med lav CO<sub>2</sub>-konsentrasjon. Biomassen i anleggene har økt og CO<sub>2</sub>-luftene har noe dårligere kapasitet enn den teoretiske kapasiteten. Det har vært relativt høy forekomst av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i flere år. I STONEHUNT-prosjektet er det vist at nefrokalsinose forsvinner ved lav CO<sub>2</sub> og at prevalensen øker ved høy karbondioksid (CO<sub>2</sub>) i vannet (Fivelstad et al. In prep.).

Blodplasma hos fisk som er eksponert for høy CO<sub>2</sub> (hyperkapni), vil få lav plasmakloridkonsentrasjon, høy konsentrasjon av bikarbonat og høyt partialtrykk av CO<sub>2</sub>. Hyperoksi (oksygenmetning over 100 %) gir lignende effekter i blodplasma, men i mindre grad. Hypotesene i forsøk 2 var at forekomsten av nefrokalsinose øker ved høy CO<sub>2</sub>, og at en ikke får utviklet nefrokalsinose ved lav CO<sub>2</sub>. I tillegg ville vi undersøke om fisk som både blir utsatt for hyperkapni og hyperoksi får økt forekomst av nefrokalsinose. Temperatur på 5°C ble valgt for å etterligne produksjon av såkalt ett-årig smolt i gjennomstrømsanlegg, som noen produsenter har opplevd å ha en økt risiko for utvikling av HSS.

Videre ønsket vi å undersøke om prosedyrene under blodprøvetaking hadde betydning for konsentrasjonene som blir målt, og om det kunne påvirke konklusjonene.

### 4.2 METODE

#### Vannkvalitetsmålinger i settefiskanlegget, under akklimatiseringen og i forsøket

Forsøket ble utført ved Industrielaboratoriet (ILAB) vinteren og våren 2021. Fisken (parr) og vannkvaliteten ble undersøkt i settefiskanlegget de siste to månedene før transporten til ILAB. Fisken var fra anlegg A, som vi tidligere hadde fulgt i AP1. Vannprøver ble tatt ut på gasstette prøveflasker, pH ble målt samme dag som prøvene ble hentet med et Thermo Orion instrument koblet til en Ross pH-elektrode og en Thermo Orion CO<sub>2</sub>-elektrode. CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen og pH ble målt tre ganger i oppdrettsanlegget (dag -80, dag -53, og dag -28), i karet parren ble hentet fra, og samme dag som prøveuttak for histopatologiske undersøkelser ble utført.

Lys- og fôringsperiodene var 12:12 i løpet av den 27 dager lange akklimatiseringsperioden. I denne perioden ble vannkvalitet målt med Ross pH-elektroden og Oxyguard CO<sub>2</sub>-måler. CO<sub>2</sub>-nivået var 2 mg L<sup>-1</sup>, og pH var 6,3-6,5 i alle de seks karene.

Under forsøket ble CO<sub>2</sub> målt minimum en gang hver dag med (Oxyguard CO<sub>2</sub> måleinstrument), og pH ble også målt minimum en gang hver dag i alle kar (Thermo Orion måleinstrument og en Ross elektrode). I tillegg ble totalkarbonat målt 1-2 ganger hver uke (Thermo Orion CO<sub>2</sub>-elektrode) og CO<sub>2</sub>-konsentrasjoner ble beregnet fra totalkarbonat-, pH- og likevektskonstanter ved 5 °C. O<sub>2</sub> og konduktivitet ble også målt daglig (WTW multi 3620 IDS; utstyrt med en WTW FDO 925 O<sub>2</sub>-elektrode og en WTW Tetracon 925-P-elektrode for konduktivitet).

Tabell 4.1. Daglige verdier for karbondioksid ( $\text{mg L}^{-1}$ ) og oksygenmetning ( $\text{DO}\%$ ) rapportert som gjennomsnitt ( $\pm$  SD) og som median  $\text{CO}_2$  for de tre gruppene (to replikater, A og B, i hver gruppe)

	Kontroll (A og B) n =148	$\text{CO}_2$ (A og B) n =148	$\text{CO}_2 + \text{O}_2$ (A og B) n =146
Gjennomsnitt $\text{CO}_2$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2,9 $\pm$ 0,41	23,3 $\pm$ 2,18	21,7 $\pm$ 2,20
Median $\text{CO}_2$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	3	23	22
Gjennomsnitt $\text{O}_2$ (%)	87,0 $\pm$ 1,8	87,5 $\pm$ 1,0	125,4 $\pm$ 3,3

## Forsøket

Individuell vekt og lengde ble målt på all fisk 7. januar 2021 (d -4, n = 112), fire dager før forsøket startet 11. januar (dag 0). Fisken ble utsatt for et 24-timers lysregime for å indusere smoltifisering og utsatt for ulike nivåer av  $\text{CO}_2$  og  $\text{O}_2$  for å oppnå de tre forsøksgruppene (Tabell 4.1.): kontrollgruppe (3  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CO}_2$  og 82-95 %  $\text{O}_2$ ),  $\text{CO}_2$ -gruppe (23  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CO}_2$  og 82-95 %  $\text{O}_2$ ) og  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ -gruppe (22  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{CO}_2$  og 115-130 %  $\text{O}_2$ ). Forsøket varte i 10 uker i ferskvann (FV), med en 6-ukers oppfølgingsstudie i sjøvann (SV) (

Tabell 4.2.)

## Blodprøver, histopatologi og vekt

Blodprøver ble tatt fra ti fisk i hver tank med tre ukers mellomrom. Blodprøvene ble tatt fra kaudalvenen ved hjelp av 1 ml hepariniserte sprøyter. Fra fem av fiskene ble blodprøven tatt etter bedøvelse (Finquel vet 0,1  $\text{g L}^{-1}$ ), mens de resterende fem fiskene ble avlivet med et kraftig slag mot hodet før blodprøvene ble tatt i løpet av 20-50 sekunder. Blodprøvene ble umiddelbart analysert for nivåer av plasmaioner ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ), plasma-pH, partialtrykk av  $\text{CO}_2$  ( $\text{PCO}_2$ ), plasma- $\text{HCO}_3^-$  og metabolitter (plasmaglukose, plasmalaktat) (ABL90+ Gem Premier, Radiometer).

Tabell 4.2. Prøvetakingsdager i løpet av forsøket som ble utført i 2021. Tall i parentes angir antall dager i sjøvann. Antall prøver er oppgitt for hver eksponeringsgruppe (to kar per gruppe). Generelt ble det tatt blodprøver av 20 fisk fra hver eksponeringsgruppe, 10 fra hvert kar. Fem fisk fra hvert kar ble avlivet med slag mot hodet og fem fra hvert kar ble avlivet med bedøvelse. På dag -4 ble det også tatt blodprøver av seks fisk fra et kar med uforstyrret fisk.

Dag nr.	Dato	Prøvetatt fisk (n)	Prøver
-4	7. januar	8	Startvekt all fisk, åtte fisk i hver gruppe ble prøvetatt for blod og vev for histopatologi. Ti fisk i hvert kar ble prøvetatt for mineralanalyser.
0	11. januar		Forsøksstart (eksponering)
16-17	27.-28. januar	20	Blod og vev til histopatologi
37-38	17.-18. februar	20	Blod og vev til histopatologi
59	11. mars	10	Blod (kun prøvetatt etter slag mot hodet) og vev til histopat.
72-73	24.-25. mars	20	Blod, vev til histopatologi og mineralanalyser. Fisk tatt av HI og HVL på dag 73 ble inkludert i vektprøve dag 74.
74	26. mars	20	Vektprøver ved avslutning ferskvann
77 (0)	29. mars		Overføring til sjøvann
94 (17)	15. april	6	Blodprøver (tatt etter slag mot hodet) og vev for histopat.
114-115 (37-38)	5-6. mai	20	Blodprøver og vev til histopatologisk undersøkelse
116	7. mai		Slutt sjøvann. Vekt

Den bakre halvdel av nyret ble delt på langs i to deler. Den ene ble brukt til histopatologisk undersøkelse, den andre ble brukt til kjemiske analyser. Prøvene for histopatologi ble fiksert i 10 % fosfatbufret formalin, innstøpt i parafinvoks og behandlet rutinemessig. Snittene ble farget med hematoksylin og eosin (HE) og et utvalg også med von Kossa-metoden (som indikerer kalk). Alle snittene ble lest blindt, dvs. uten å vite hvilken gruppe fisken tilhørte. NK ble definert som kalsiumlignende avleiringer i nyrets ekskresjonssystem. Alvorlighetsgraden ble kategorisert som NK1 = mild (kalsiumlignende utfellinger observert i 1-5 tubuli), NK2 = moderat (6-20), NK3 = uttalt (21-40) og NK4 = svært uttalt (> 40) (Fivelstad et al. 2018; Rodger & Richards, 1998).

Fisken og forsøket ble overvåket minimum en gang per dag, og døende og død fisk ble fjernet og undersøkt.

Nyreutfellinger ble analysert ved hjelp av infrarød spektroskopi ved Akershus universitetssykehus, Laboratorium for tverrfaglig laboriemedisin og medisinsk kjemi (Morten K. Moe) (Kravdal et al. 2015).

### Statistiske analyser

Den statistiske analysen av bloddata og vekstparametre omfattet enveis ANOVA, etterfulgt av Tukeys HSD post hoc-test. Statgraphics Centurion 16 (Statpoint technologies Inc., Virginia) og Statistica (versjon 12, Statsoft Inc., Tulsa, OK, 1993) ble brukt i disse analysene. Moods median-test ble brukt for å sammenligne medianverdiene for vekstparametrene der datamaterialet ikke var normalfordelt. Lineær regresjon ble brukt for å finne sammenhenger mellom nefrokalsinose nivå og blodparametre. Leverage ble brukt for å undersøke om noen av datapunktene hadde for stor innflytelse. I tillegg ble likhet i variansene testet med Levene's test (Brown og Forsythe, 1974). Forskjeller i prevalens av nefrokalsinose og assosiasjon mellom NK og HSS ble beregnet ved hjelp av kji-kvadrattest.

Selv om alle blodprøvene ble analysert umiddelbart, gikk det lengre tid mellom håving og prøvetaking når fisken var bedøvet enn når den ble slått i hodet. Plasmaprøvene fra bedøvd fisk ble derfor ikke inkludert i den generelle beskrivelsen av de fysiologiske parametrene hos fisken. Alle fiskene ble imidlertid brukt i den statistiske behandlingen av vekt og histologi.

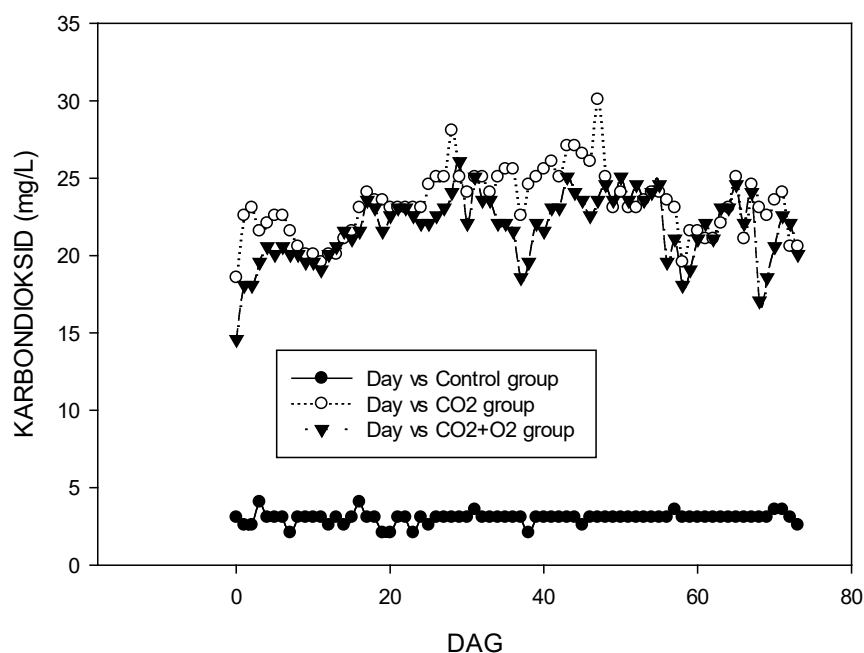
Forsøket var godkjent av Forsøksdyrutvalget (FOTS ID 25197).

## 4.3 RESULTAT

### Vannkvalitet

CO<sub>2</sub>-målingene i settefiskanlegget før akklimatiseringsperioden i laboratoriet viste et CO<sub>2</sub>-nivå på mellom 8 og 11 mg L<sup>-1</sup> (n = 3) og pH i området 6,1-6,2. I løpet av akklimatiseringsperioden lå CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen i området 2-3 mg L<sup>-1</sup>. For forsøksgruppene var det gjennomsnittlige CO<sub>2</sub>-nivået i vannet 23,3 mg L<sup>-1</sup> og 21,7 mg L<sup>-1</sup> for henholdsvis CO<sub>2</sub>-gruppen og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen. Dette var i samsvar med de planlagte forsøksbetingelsene og viste ingen signifikant forskjell mellom gruppene. Gjennomsnittsnivået i kontrollgruppen var 2,9 mg L<sup>-1</sup> (Tabell 4.1.). Variasjonene i CO<sub>2</sub>-konsentrasjonene er vist i Figur 4.1. Gjennomsnittlig O<sub>2</sub>-nivå var 87,0, 87,5 og 125,4 prosent i henholdsvis kontrollgruppen, CO<sub>2</sub>-gruppen og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen (Tabell 4.1.).



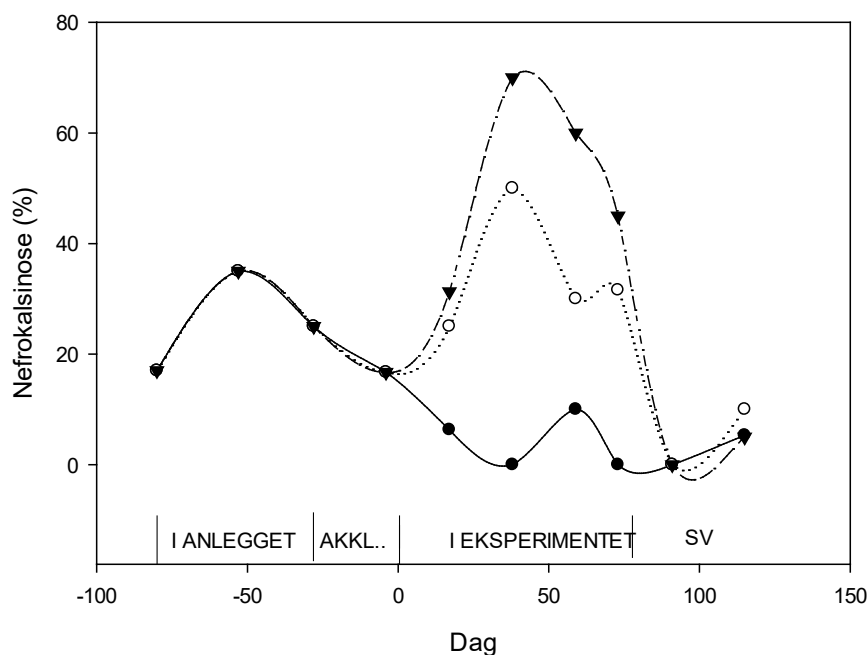


Figur 4.1. Karbondioksidkonsentrasjoner under forsøket. ●representerer kontrollgruppen, ○ er CO<sub>2</sub> gruppen og ▼ er CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> gruppen

### Forekomst av nefrokalsinose

Forekomsten av nefrokalsinose hos forsøksfiskene er basert på den histopatologiske undersøkelsen. Endringene i forekomsten av NK i perioden før akklimering til slutten av SV-perioden er beskrevet i Figur 4.2. Forekomsten av NK var 25 % før den fire uker lange akklimeringsperioden (3 mg L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>), og sank til 16,7 % (dag -4) før forsøksperioden startet. Utviklingen av NK økte raskt i begge forsøksgruppene, og i løpet av eksponeringsperioden var det ingen signifikant forskjell i forekomsten av NK mellom de to gruppene ( $p < 0,05$ ). I kontrollgruppen forsvant de histopatologiske tegnene på nefrokalsinose. I CO<sub>2</sub>+ O<sub>2</sub>-gruppen var det signifikant replikatforskjell i forekomsten av NK (Tabell 4.3). Etter overgang til sjøvann var det bare få observasjoner av NK i forsøksfiskene.

Et flertall av fiskene som fikk påvist nefrokalsinose (65 %) hadde milde funn. Hos 32 % var funnene moderate (grad 2) og 3 % hadde nefrokalsinose grad 3. Det var ikke forskjell i alvorlighetsgrad mellom CO<sub>2</sub>-gruppen og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen (Figur 4.3) og heller ikke mellom de to replikatene i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen. Fordeling over tid i eksponeringsperioden av alvorlighetsgrad av NK for de tre forsøksgruppene er vist i Figur 4.3.



Figur 4.2. Nefrokalsinose i oppdrettsanlegget, i forsøket og i sjøvannsperioden. ●representerer kontrollgruppen, ○ er CO<sub>2</sub> gruppen og ▼ er CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> gruppen

Tabell 4.3. Forekomst av nefrokalsinose i eksperimentperioden per tank (A og B) og gruppe ved hvert prøveuttak og samlet for henholdsvis ferskvanns- og sjøvannsperioden. fv = ferskvann, sv = sjøvann, prøveuttak dag 37-38 sv tilsvarer dag 114-115 av hele undersøkelsesperioden.

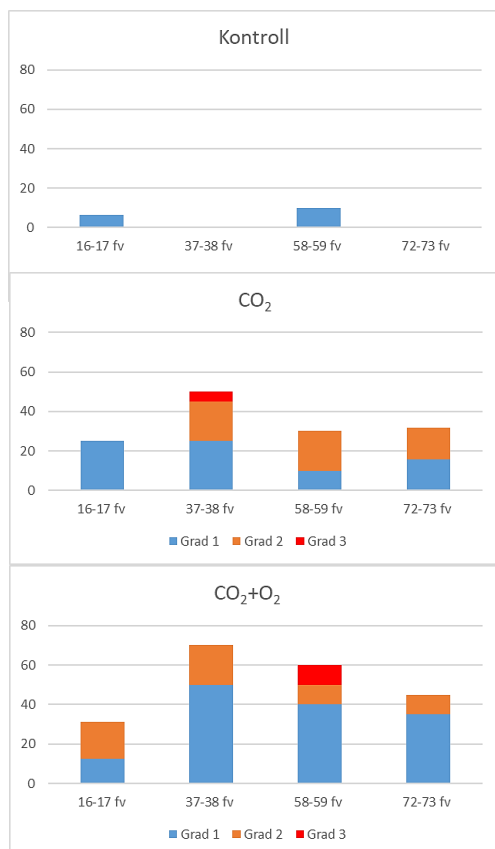
Dag	Prøver per tank N	Kontrollgruppe			CO <sub>2</sub> -gruppe			CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub> -gruppe		
		A	B	Total	A	B	Total	A	B	Total
-4	4	1	1	25	0	0	0	1	1	25
16-17 fv	8	0	1	6,3	1	3	25	2	3	31,3
37-38 fv	10 (9)	0*	0	0	5	5	50	6	8	70
58-59 fv	5	1	0	10	2	1	30	3	3	60
72-73 fv	10 (9)	0	0	0	4	2*	31,6	2	7	45
Total per tank	33 (32)	1 <sup>#</sup>	1		12	11 <sup>#</sup>		13	21	
Total per gruppe fv	66 (65)	2 <sup>^</sup>		3,1	23 <sup>^</sup>		35,4	34		51,5
18 sv	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37-38 sv	10 (9)	0*	1	5,3	2	0	10	1	0	5
Total per gruppe sv	26 (25)	1 <sup>#</sup>		4	2		7,7	1		3,8

\*: Prøveresultat fra 9 i stedet for 10 fisk (N=9)

<sup>#</sup>: Totalt antall prøveresultat per tank var 32 (N=32)

<sup>^</sup>: Totalt antall prøveresultat per gruppe var 65 (N=65)

<sup>#</sup>: Totalt antall prøveresultat i gruppen var 25 (N=25)

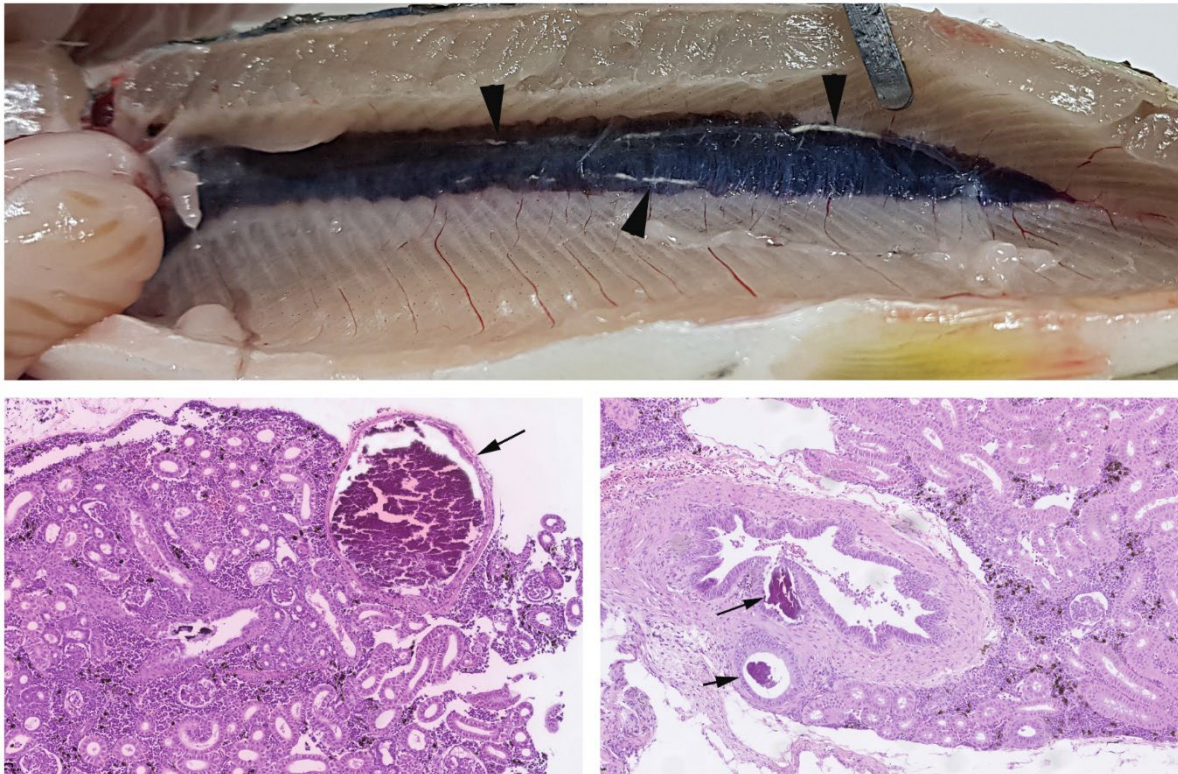


Figur 4.3. Fordeling (%) over tid i eksponeringsperioden av alvorlighetsgrad av NK for de tre forsøksgruppene. Alle prøver fra ferskvann (fv).

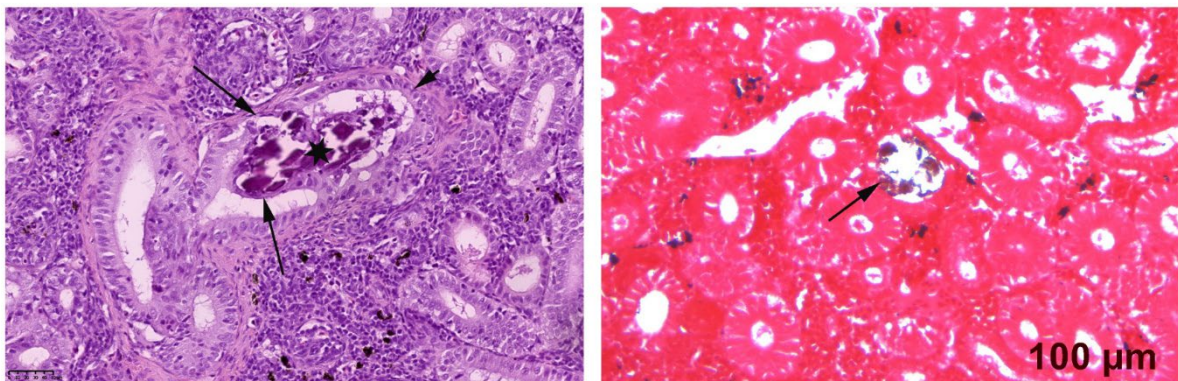
## Makro- og histopatologiske funn

Nefrokalsinose av mild og moderat grad påvist ved den histopatologiske undersøkelsen var oftest ikke synlig ved obduksjon av fisken. I mer uttalte tilfeller ble det observert lyse og langsgående, litt prominere striper i nyrekanten (Figur 4.4). Ved histopatologi ble dette bekreftet som NK ved at samlerørene for urindannelsen var utvidet og fylt med kalkholdig materiale. Kalkholdige utfellinger ble påvist helt bak i urinleder og urinblære. Det var skade på overflateceller (epitelet) i utførselsganger med utfelt materiale, også hos fisk med NK av mild grad (Figur 4.5).

I tillegg til histopatologiske undersøkelse av nyre er det fra alle tre grupper i midtuttak (d 37) og sluttuttak før overgang til sjø (d 72) også undersøkt gjelle (N=118), hjerte (N=118) og pseudobrank (N=122, som inkluderer 14 fra d 0). Det ble ikke gjort spesifikke histopatologiske funn i gjelle. I hjerte var det to fisk med blødning (begge med HSS), men ellers var det ingen spesifikke funn. I pseudobrank ble det observert nedslag av kalkholdig materiale i 41 % (50/122) av prøvene og de aller fleste (85,4 %) var i de to eksponerte gruppene. Det var signifikant assosiasjon mellom å ha fått påvist nefrokalsinose og funn av kalk i pseudobrank ( $p < 0,0001$ ).



Figur 4.4. Nefrokalsinose. Laks fra eksponeringsforsøket med lyse striper i nyrekanten som indikerer kalkholdige utfellinger i nyrets samlerør for urin (øverste bilde). Histopatologi av dilatert samlerør med kalkholdig materiale (nederst til v., pil). Histopatologi med kalkholdig materiale i samlerør og urinleder (nederst til h., liten og stor pil).



Figur 4.5. Histopatologi av nyre med nefrokalsinose av mild grad (få deler av tubulisystemet affisert). Kalkholdig materiale (bilde til v., asterisk). Overflateceller i tubuli er ødelagt (lange piler), normale overflateceller (kort pil). Kalkholdig materiale blir brunt med von Kossa-farging (til h., pil)

### Sammensetning av nyreutfellinger

Nyreutfellinger ble analysert både i prøver fra fisk under eksperimentelle betingelser og fra fisk i et settefiskanlegg (Tabell 4.4.). Det ble bare påvist fosfatsteiner, og kalsiumholdig Dahlitt dominerte. Alle de fire feltprøvene og prøver av to av laboratoriefiskene inneholdt også en magnesiumforbindelse (struvitt). Tre av prøvene fra forsøksfiskene inneholdt i tillegg noe kalsiumholdig brushitt.

Tabell 4.4. Sammensetning av nyreutfellingene. Mengden er angitt i prosent av prøven, som også inneholdt en andel nyrevev (alltid til stede ved slike undersøkelser). Alle feltprøvene er fra samme anlegg.

Opprinnelse	amCAP	MAP	Brushitt	Nyrevev
Ekspirement	20			80
Ekspirement	50	10	10	30
Ekspirement	20			80
Ekspirement	40		10	50
Ekspirement	60	10	10	20
Ekspirement	20			80
Ekspirement	90			10
Settefiskanlegg	50	20		30
Settefiskanlegg	50	20		30
Settefiskanlegg	50	30		20
Settefiskanlegg	80	10		10

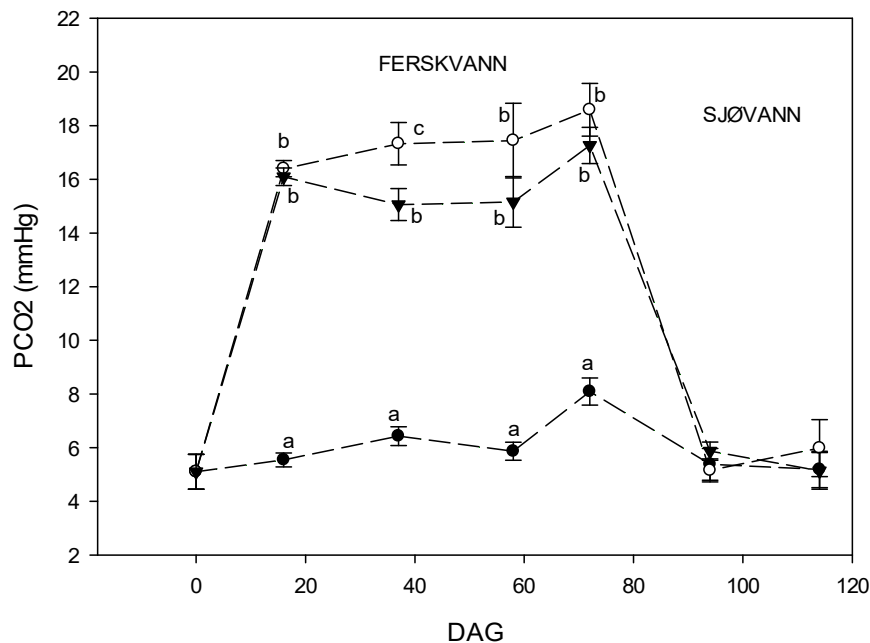
amCAP: amorf karbonatapatitt (Dahllitt)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$

MAP: magnesium ammoniumfosfat (struvitt)  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Brushitt: kalsiumhydrogenfosfat dihydrat  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

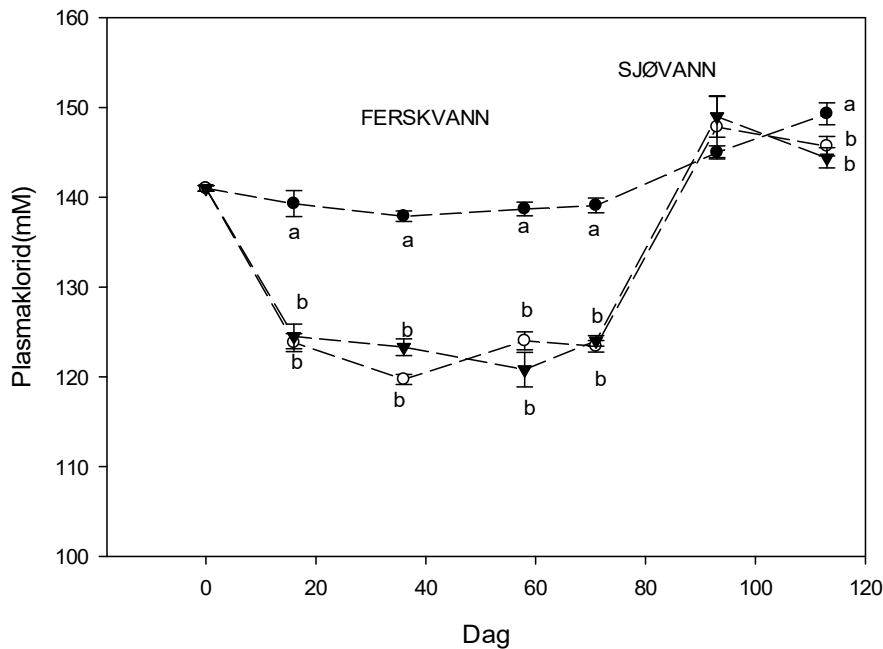
## Blodparametre

Plasmanivåene av  $\text{PCO}_2$  i de to forsøksgruppene (Figur 4.6.) var signifikant høyere enn i kontrollgruppen gjennom hele FV-perioden. Selv om  $\text{PCO}_2$  for  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ -gruppen var noe lavere sammenlignet med  $\text{CO}_2$ -gruppen, ble det bare funnet signifikante forskjeller på dag 37-38 ( $p < 0,05$ ).



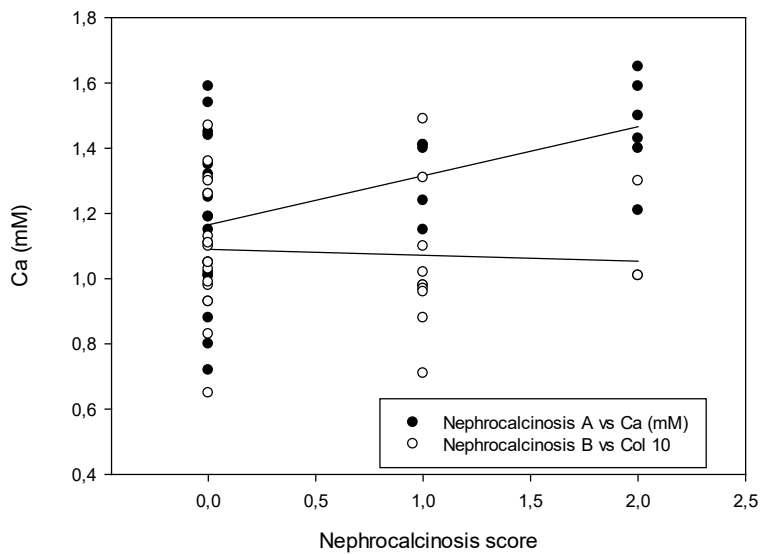
Figur 4.6. Partialtrykket i blodplasma (gjennomsnitt  $\pm$  1SE) under forsøket. ● representerer kontrollgruppen, ○ er  $\text{CO}_2$  gruppen og ▼ er  $\text{CO}_2 + \text{O}_2$  gruppen. Gjennomsnitt som er merket med forskjellige bokstaver er signifikant forskjellige.

Plasma-pH i de to forsøksgruppene var signifikant høyere enn i kontrollgruppen ved to prøvetakinger (dag 37-38 og 72-73). Gjennomsnittlig konsentrasjon av plasmaklorid (Figur 4.7.) for de to forsøksgruppene var signifikant redusert sammenlignet med kontrollgruppen på alle prøvetakingsdagene i FV (p<0,05).



Figur 4.7. Plasmaklorid (gjennomsnitt  $\pm$  1SE) under forsøket. ● representerer kontrollgruppen, ○ er CO<sub>2</sub> gruppen og ▼ er CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> gruppen. Gjennomsnitt som er merket med forskjellige bokstaver er signifikant forskjellige.

Det var en tendens til økt Ca<sup>2+</sup>-nivå i plasma i de to forsøksgruppene i løpet av de første fem ukene, men deretter ble det ikke funnet noen trender. Det ble funnet en signifikant sammenheng mellom Ca<sup>2+</sup> i plasma (mM) og NK-score etter ca. 5 uker (dag 37-38), men bare hos fisk bedøvet med Finquel vet 0,1 g L<sup>-1</sup> (Figur 4.8.).



Figur 4.8. Plasmakalsium versus nefrokalsinose score etter ca. 5 uker (dag 37-38) for fisk som ble bedøvd før blodprøvetaking (nefrokalcinose A (●) og for fisk avlivet med slag mot hodet (nefrokalcinose B (○)).

Tabell 4.5. Gjennomsnittlige ( $\pm 1SE$ ) hormonskonsentrasjoner av T3 (trijodtyronin) og T4 (tyroksin) under forsøket og oppfølgingsstudien i sjøvann. Tall i parentes er  $n$  = antall prøver. Gjennomsnittsverdier med ulike bokstaver er signifikant forskjellige ( $p < 0,05$ ).

Dag	Kontroll	T3 (ng ml <sup>-1</sup> )		T4 (ng ml <sup>-1</sup> )		
		CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +O <sub>2</sub>	Kontroll	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +O <sub>2</sub>
37-38	3,0 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> (7)	2,7 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup> (3)	3,8 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup> (6)	5,3 $\pm$ 0,80 (7)	5,7 $\pm$ 1,14 (3)	11,7 $\pm$ 4,37 (5)
72-73	3,7 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup> (10)	3,9 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup> (10)	5,1 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup> (8)	8,3 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup> (10)	6,4 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup> (10)	5,8 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup> (8)
114-115	0,8 $\pm$ 0,28 (8)	1,3 $\pm$ 0,26 (10)	1,3 $\pm$ 0,25 (10)	2,4 $\pm$ 0,70 (9)	3,9 $\pm$ 0,85 (8)	3,4 $\pm$ 0,67 (10)

Etter fem ukers (dag 37-38) eksponering var gjennomsnittlig T3 signifikant økt i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen (Tabell 4.5;  $p < 0,05$ ). Samtidig ble det funnet høye T4-verdier i denne gruppen, spesielt i en av replikatene, noe som resulterte i en høy gjennomsnittsverdi, selv om den ikke var signifikant forskjellig mellom gruppene. Interessant nok hadde vi også de mest markante patologiske funnene, både for nefrokalsinose og HSS i akkurat dette replikate karet i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen med høye T4-verdier. Dag 72-73 var T3 i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen signifikant høyere, og gjennomsnittlig T4-konsentrasjon var nå signifikant redusert i både CO<sub>2</sub>- og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Vi fant ingen forskjeller mellom gruppene ved slutten av sjøvannsperioden, men hormonnivåene var lavere sammenlignet med slutten av ferskvannsperioden.

## Vekstparametre

Medianverdien presenteres her i stedet for gjennomsnittet, ettersom vektdataene ikke var normalfordelte. Medianvekten til CO<sub>2</sub>-gruppen var signifikant redusert sammenlignet med kontrollgruppen ved slutten av FV-perioden og ved slutten av SV-perioden ( $p < 0,05$ ; Tabell 4.6. ). Det var bare små forskjeller i fiskelengde både i ferskvanns- og sjøvannsperioden. Når det gjelder kondisjonsfaktor, var den eneste signifikante forskjellen mellom CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen. Kondisjonsfaktor var lavest i CO<sub>2</sub>-gruppen. I FV-perioden var gjennomsnittlig (og median) SGR for CO<sub>2</sub>-gruppen signifikant redusert sammenlignet med kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ). SGR for CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen lå mellom SGR for kontrollgruppen og CO<sub>2</sub>-gruppen, og var signifikant forskjellig fra begge disse gruppene (Figur 4.9.).

Tabell 4.6. Moods median-test for vekt per gruppe før forsøket startet, ved slutten av ferskvannsperioden og ved slutten av sjøvannsperioden. KG betyr konfidensgrense og a betyr signifikant forskjellig fra kontrollgruppen ( $p < 0,05$ )

Dag	GRUPPE	n	n≤	n>	Median (g)	95% nedre KG (g)	95% øvre KG (g)
-4	K	224	117	107	108,0 <sup>a</sup>	105,4	111,0
	CO2	224	108	116	109,2 <sup>a</sup>	106,8	111,4
	CO2+O2	223	111	112	108,8 <sup>a</sup>	106,5	112,2

Test statistikk = 0,7351 P = 0,69

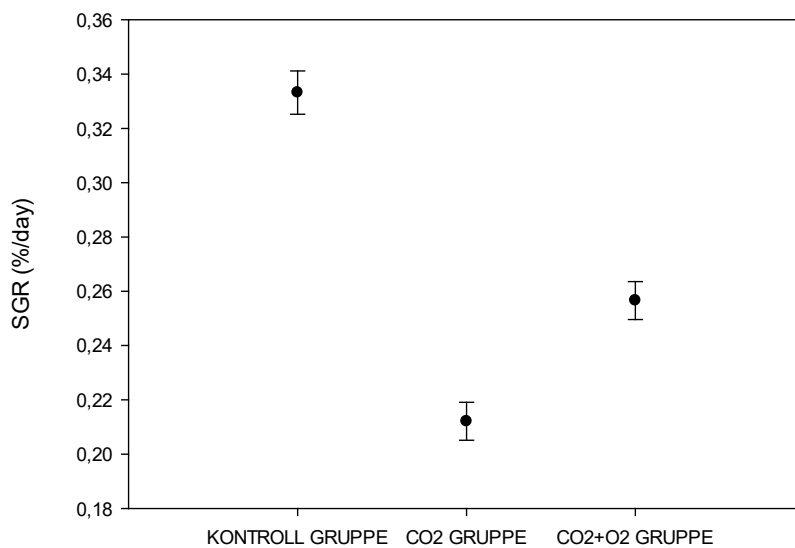
Dag	GRUPPE	n	n≤	n>	Median(g)	95% nedre KG (g)	95% øvre KG (g)
74	K	170	66	104	139,8 <sup>a</sup>	134,9	145,0
	CO2	170	106	64	128,9 <sup>b</sup>	125,0	130,2
	CO2+O2	164	81	83	131,4 <sup>ab</sup>	128,9	136,0

Test statistikk = 18,89 P = 0,0001

Dag	GRUPPE	n	n≤	n>	Median(g)	95% nedre KG (g)	95% øvre KG (g)
116	K	64	23	41	160,4 <sup>a</sup>	152,5	173,9
	CO2	64	40	24	144,2 <sup>a</sup>	139,3	151,7
	CO2+O2	56	29	27	151,0 <sup>ab</sup>	142,6	156,0

Test statistikk = 9,134 P = 0,010





Figur 4.9. Gjennomsnittlig SGR (%/dag basert på individuell SGR for hver fisk) og standardfeil for smolten i de tre gruppene i ferskvannsperioden.

## 4.4 DISKUSJON

### Vannkvalitet

Forsøket ble utført i bløtt vann ( $\text{Ca}^{2+}$  1 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{Cl}^-$  3 mg L<sup>-1</sup>,  $\text{Na}^+$  3 mg L<sup>-1</sup> i kontrollgruppen. I forsøksgruppene var  $\text{Na}^+$  konsentrasjonen 6 mg L<sup>-1</sup> grunnet tilsetning av  $\text{NaHCO}_3$  som buffer. Ifølge Summerfelt (2006) kan alkalinitet ha betydning for fiskens  $\text{CO}_2$ -toleranse. Gray (2010) definerer vann med lav alkalinitet som vann med en alkalinitet lavere enn 0,5 mM. NK er imidlertid funnet i  $\text{CO}_2$ -forsøk utført både i vann med høy (Fivelstad et al., 1999, 2003b; Smart et al., 1979) og lav alkalinitet (Fivelstad et al., 1998; Hosfeld et al., 2008). I det nåværende forsøket var alkaliniteten under 0,5 mM (0,2-0,3 mM), noe som representerer et forsøk ved lav alkalinitet.

Den fysiologiske kapasiteten til gjellene hos laksefisk kan svekkes av aggregering av labilt Al (Kroglund og Finstad 2003, Fivelstad et al. 1998), spesielt under pH 6,0. I denne undersøkelsen var fraksjonen av labilt Al i vannet lavere enn 5 µg L<sup>-1</sup>, som er innenfor grenseverdiene, og pH i alle tre gruppene var over 6,1. Mattilsynet har anbefalt en  $\text{CO}_2$ -grense på 15 mg L<sup>-1</sup> for parr og smolt (VKM 2012).  $\text{CO}_2$ -konsentrasjonene i forsøksgruppene i denne undersøkelsen var dermed over det anbefalte sikkerhetsnivået for  $\text{CO}_2$ . Tidligere undersøkelser av vannkvaliteten i norske settefiskanlegg har vist  $\text{CO}_2$ -verdier over denne grensen i 30 % av de undersøkte anleggene, med toppverdier på opptil 30 mg L<sup>-1</sup> (Kristensen et al., 2009). Det finnes ikke tilsvarende oppdaterte verdier for  $\text{CO}_2$ -konsentrasjonen i norske settefiskanlegg i dag, men en må anta at selv om næringen forsøker å holde  $\text{CO}_2$ -konsentrasjonen under denne grenseverdien på 15 mg L<sup>-1</sup>, vil det fortsatt være store variasjoner.  $\text{O}_2$ -metningen var ca. 125 % i en av forsøksgruppene. Dette nivået ble bestemt ut fra kunnskapen om at moderat hyperoksi ( $\text{DO} \% > 100$ ) også er vanlig i kommersielle settefiskanlegg (Rosten, 2009), med verdier opp til  $\text{DO} \% 140$  som en potensiell stressfaktor, men uten akutt toksisk effekt på gjeller eller andre overflateepitel (Thorarensen og Farrell, 2011).

### Nefrokalsinosedynamikk

Betydningen av regelmessig forekomst av NK i kommersielt lakseoppdrett understøttes av forhistorien til testfisken, som hadde blitt diagnostisert med NK på et nivå på 25 % (15/59) i løpet av de to

månedene med observasjon før ankomst til forsøkslaboratoriet og eksponering for kontrollnivå av CO<sub>2</sub> i akklimatiseringsperioden.

Etter eksponering for hyperkapni skjedde utviklingen av NK i alle de fire eksponerte karene relativt raskt, med økt forekomst etter 16 dager og en betydelig økning etter fem uker. Nedgangen til nesten null NK i kontrollgruppen i løpet av forsøksperioden viser at NK forsvinner ved lav CO<sub>2</sub>. NK ble også redusert til nær null i forsøksgruppene etter overføring til sjøvann (lav CO<sub>2</sub>). Den umiddelbare helingen av NK i de eksponerte gruppene etter overføring til normalt sjøvann, er en viktig observasjon som indikerer en terskel for når forhøyede verdier av CO<sub>2</sub> i miljøet induserer fysiologiske endringer og nyreskader. Verdier under denne terskelen vil føre til redusert forekomst av NK. Dette er også i samsvar med studien til Fivelstad et al. (1999).

Alle histopatologiske lesjoner lignet på tidligere beskrivelser av NK (Smart et al., 1979), og det ble ikke observert noen forvekslings- eller differensialdiagnoser. Lesjonene var hovedsakelig milde til moderate, og det var ingen unormal atferd eller dødelighet relatert til NK i denne studien.

### CO<sub>2</sub> i vannet, i plasmaet og urinen

En økning i PCO<sub>2</sub> i omgivelsene vil øke PCO<sub>2</sub> i plasma og redusere CO<sub>2</sub>-gradienten mellom fisken og vannet (Jansen og Randall, 1975). På samme måte kan plasma-PCO<sub>2</sub> øke som følge av hyperoksi i omgivelsene, på grunn av redusert ekstern respirasjon og akkumulering av metabolsk CO<sub>2</sub> (Brauner et al. 2000, Heisler, 1984, Hosfeld et al. 2008, Skov et al. 2019, Wood 1991). I dette forsøket var det ingen signifikante forskjeller i PCO<sub>2</sub> mellom de to eksponeringsgruppene, til tross for at en av forsøksgruppene også ble utsatt for hyperoksi. Dette kan tyde på at det interne PCO<sub>2</sub>-nivået hovedsakelig ble bestemt av PCO<sub>2</sub>-nivået i omgivelsene. Det forhøyede PCO<sub>2</sub>-nivået i plasma forårsaket en økning i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> i både CO<sub>2</sub>- og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen. Dette er en fysiologisk mekanisme som bidrar til å stabilisere pH når fisken blir eksponert for et surt og CO<sub>2</sub>-belastet miljø. Preurin dannes ved fysisk filtrering av plasma fra kapillærkarene i glomerulus til Bowmans hulrom i nyret, og PCO<sub>2</sub> og HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> i preurin gjenspeiler nivåene i plasma. Nivåene av PCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (og Ca<sup>2+</sup>) i preurin i forsøksgruppene var derfor antakelig høye. Særlig forholdet mellom konsentrasjonen av bikarbonat og CO<sub>2</sub> vil påvirke pH i urinen.

Funnene i de kjemiske analysene samsvarer med andre norske studier der konkrementer i nyre hos atlantisk laks er analysert (Thomsen 2019, Klykken et al. 2022). Kalsium-, magnesium- og ammoniumfosfatkonkrementer innen human- og veterinærmedisin (hund) er typiske infeksjonssteiner, assosiert med urinveisinfeksjoner. De kan også dannes ved overskudd av kalsium i urinen. Urinen må være basisk for at disse skal dannes og normal pH hos laks er anslått å være 7,5 (Roy and Lall 2004). Det kan derfor antas at normal urin hos laks er predisponert for dannelse av denne type utfellinger hvis andre forhold ligger til rette for det.

### Plasma Ca, nefrokalsinose og anestesi

Plasma Ca<sup>2+</sup> var økt hos fisk med moderat histopatologisk score av NK i nyrevevet, men bare hos fisk eksponert for anestesi. Denne økningen kan være et resultat av Ca<sup>2+</sup> mobilisering fra muskel mens fisken ligger i bedøvelsesvannet. Klykken et al. (2022) observerte en signifikant økning i Ca<sup>2+</sup> i plasma hos atlantisk laksesmolt med NK, og andelen fisk med hyperkalsemi økte med økende alvorlighetsgrad av NK. Den samme studien identifiserte et normalområde for Ca<sup>2+</sup> i plasma hos frisk smolt på 2,1-3,4 mmol L<sup>-1</sup> og hyperkalsemi hos fisk over dette. I våre forsøk ble det imidlertid funnet at de gjennomsnittlige plasmanivåene lå i området 1,0 -1,4 mmol L<sup>-1</sup> for alle gruppene. Det bør bemerkes at Klykken et al. (2022) også utsatte fisken for anestesi før blodprøvetakingen.

## 5 HEMORRAGISK SMOLTSYNDROM (HSS)

---

Av: Anne Berit Olsen<sup>2</sup>, Camilla Diesen Hosfeld<sup>1</sup>, Sofie Charlotte Remø<sup>3</sup>, Kai Inge Lie<sup>4</sup>, Arve Nilsen<sup>2</sup>, Ingunn Sommerfeldt<sup>2</sup>, Mona Gjessing<sup>2</sup>, Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>

### 5.1 INNLEDNING

Hemorragisk smoltsyndrom (HSS) eller hemorragisk diatese (HD) er en blødersykdom som rammer laks i settefiskfasen (Rodger og Richards, 1998), gjerne i rent ferskvann før og under smoltifisering. Årsaken(e) er ukjent, men siden tilstanden ble observert i et tidligere CO<sub>2</sub>-eksponeringsforsøk (Fivelstad et al. 1999) var det håp om at den kunne dukke opp igjen under lignende eksperimentelle betingelser og dermed studeres mer inngående. Sykdommen er karakterisert ved en generell blødningstendens og et typisk funn er blødning til nyrets ekskresjonssystem. Det er antatt at milde funn av blødning til nyretubuli representerer et tidlig tegn på HSS.

### 5.2 METODE

I studien er de samme nyreprøvene som ble undersøkt for nyreforkalkning (se Kapittel 3 og 4) også undersøkt for tubuliblødning og tilhørende funn, gradert som mild HSS (score 1 = røde blodlegemer i 1-5 tubuli), moderat (score 2 = røde blodlegemer i 6-20 tubuli) og uttalt (score 3 = røde blodlegemer i > 20 tubuli). I tillegg er svimere og selvdød fisk undersøkt og funn beskrevet. For disse fiskene ble det gjort en histopatologisk undersøkelse av de fleste organ og nyre ble undersøkt for bakterier. I tillegg ble noen fisk undersøkt for piscint orthoreovirus (PRV) ved hjelp av real time RT-PCR.

For transmisjonselektronmikroskopi (TEM) er nyrebiter (1x1 mm) skjært ut fra parafinblokker, deparafinert og rehydrert og overført og vasket i 0,1 M fosfatbuffer. Prøvene ble så fiksert i 1 % osmium tetraoxid, videre preparert, vasket og dehydrert før innstøping i epon. Ultratynne snitt ble lagt på kobbergrider, impregnert og mikroskopert. (Preparering er utført ved NMBU Imaging Centre av Lene Cecilie Hermansen).

### 5.3 RESULTAT

#### Forekomst

Ved ordinære prøveuttak i forsøk 2 ble det i alt undersøkt 220 nyreprøver i eksponeringsperioden i ferskvann og 77 i løpet av perioden i sjø (se oversikt over prøveuttak *Tabell 4.2.*). Fisk med HSS ble påvist allerede ved første prøveuttak 27. januar (d 16). Forekomsten av mild til uttalt nyreblødning/HSS var som vist i *Tabell 5.1*. Av de 23 individene som ble registrert med HSS under ordinære uttak, hadde 16 (70 %) milde funn, 4 (17,4 %) moderate funn og 3 fisk (13 %) uttalt HSS. I tillegg ble det gjennom forsøket funnet sju døende og død fisk, som alle ble diagnostisert med velutviklet HSS. I ferskvannfasen ble det derfor påvist nyreblødning/HSS i totalt 30 individer. Det ble påvist HSS i alle gruppene, også i kontrollfiskene, men flest i ett av CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-replikatenes (*Tabell 5.1* og *Figur 5.1*). I dette karet var det en overvekt av påvisninger under ordinære prøveuttak og det var også her seks av de sju døende og døde fiskene med HSS ble funnet.

Nyreblødning/HSS ble påvist gjennom hele forsøksperioden i ferskvann og forsvant etter at fisken ble satt på sjøvann (*Figur 5.2*) (kun en påvisning, mild HSS).

Tabell 5.1. Forekomst av hemorragisk smoltsyndrom (HSS) per tank og gruppe ved hvert prøveuttak og samlet for henholdsvis ferskvanns- og sjøvannsperioden. HSS ekstra = døde og døde fisk samlet utenom ordinære prøveuttak, fv = ferskvann, sv = sjøvann, prøveuttak dag 37-38 sv tilsvarer dag 114-115 av hele undersøkelsesperioden.

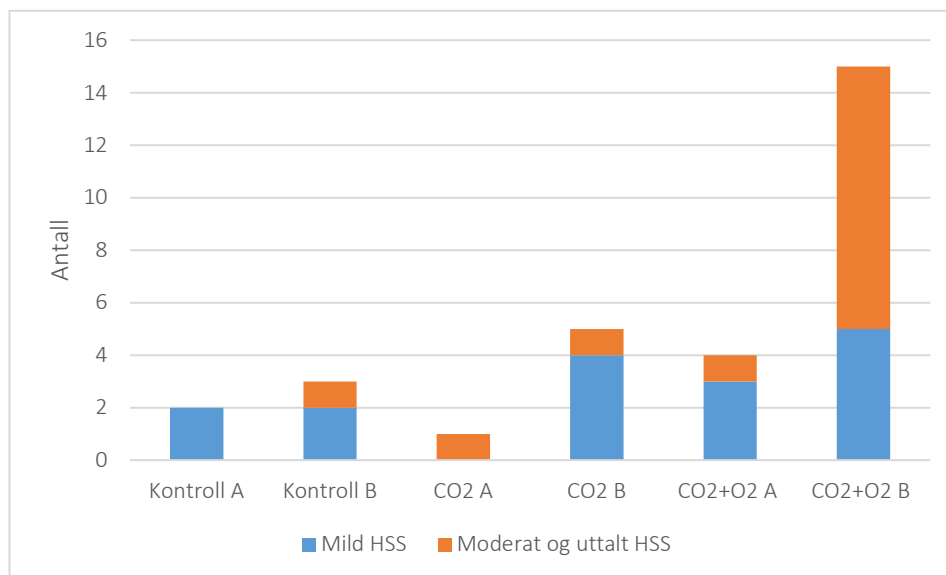
Dag	Prøver per tank	Kontroll			CO <sub>2</sub>			CO <sub>2</sub> + O <sub>2</sub>		
	N	n	B	%	n	B	%	n	B	%
-4 fv	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16-17 fv	8	0	1	6,3	0	1	6,3	1	1	12,5
37-38 fv	10 (9)	0*	0	0	0	1	10	1	2	15
58-59 fv	5	1	0	10	0	1	10	1	2	30
72-73 fv	10 (9)	1	1	10	1	2*	15,8	1	4	25
Total per tank	33 (32)	2 <sup>‡</sup>	2		1	5 <sup>‡</sup>		4	9	
Total per gruppe fv	66 (65)	4 <sup>^</sup>			6 <sup>^</sup>			13		
HSS ekstra		1						6		
18 sv	3	0	0		1	0		0	0	
37-38 sv	10 (9)	0*	0		0	0		0	0	
Total per gruppe sv	26 (25)	0 <sup>#</sup>			1			3,8		

\*: Prøveresultat fra 9 i stedet for 10 fisk (N=9)

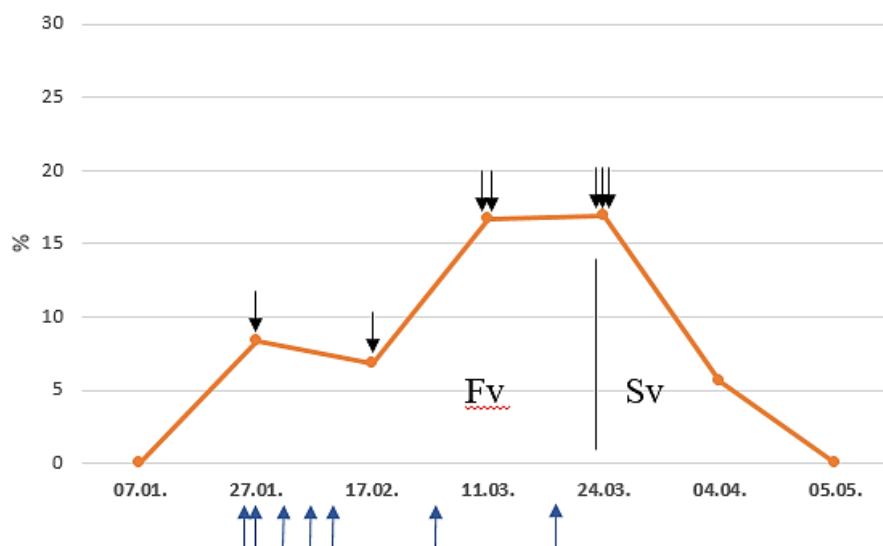
‡: Totalt antall prøveresultat per tank var 32 (N=32)

<sup>^</sup>: Totalt antall prøveresultat per gruppe var 65 (N=65)

<sup>#</sup>: Totalt antall prøveresultat i gruppen var 25 (N=25)



Figur 5.1. Fordeling per tank av fisk med mild HSS og moderat/uttalt HSS.



Figur 5.2. Forekomst av HSS over tid gjennom ferskvanns- og sjøvannsperioden. Svart pil: Fisk med HSS grad 2 og 3 påvist ved ordinære prøveuttak. Blå pil: HSS påvist i døende/død fisk i tillegg til ordinære uttak.

### Patomorfoloisk beskrivelse av HSS

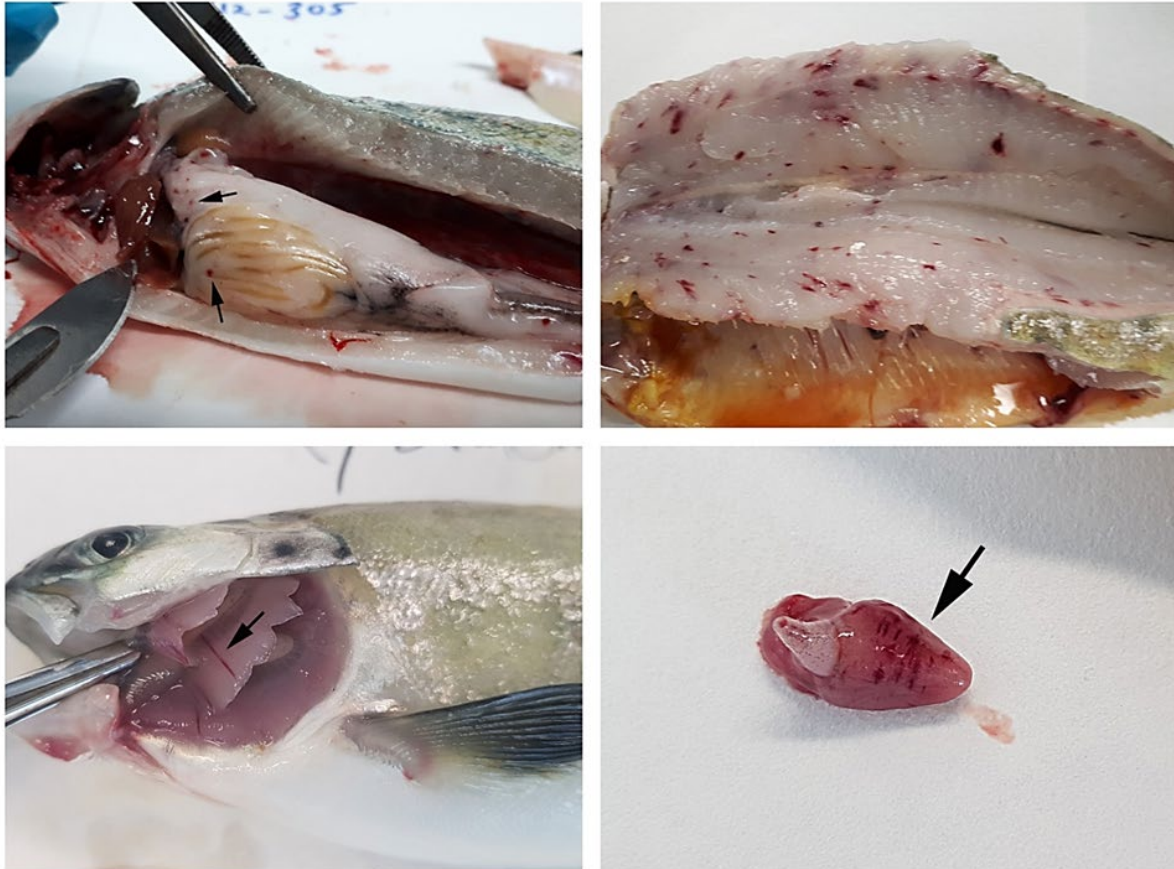
Ved undersøkelsen av døende og død fisk ble det påvist utbredt blødningstendens både punktblødninger (petekkier) og større blødninger (ekkymoser) (Figur 5.3. og Figur 5.4.). Fiskene hadde blødning ved basis av brystfinnene, i gjelle og i øyemuskel. Ved åpning av fisken var blødninger spesielt synlige i buk fett og i skjelettmuskulatur. Ved den histopatologiske undersøkelsen var det særlig nyre som var affisert med blod i ekskresjonssystemet (nefronet) der urinen dannes (Figur 5.3. og Figur 5.4.). Blod ble påvist i alle deler av utførselsystemet, også i urinrommet (Bowmans rom) som omgir kapillarnøstene (glomeruli) der urindannelsen skjer ved filtrasjon av blodet (Figur 5.5 og Figur 5.6). Urinrommet går over i tubulisystemet der preurinen prosesseres til ferdig urin. Det var også blødning i nyrevevet som omgir nefronet. Ved mild og moderat HSS ble det ikke påvist blødning utenfor tubuli.

### Undersøkelse for bakterier

De sju døende og døde fiskene som ble diagnostisert med HSS, ble undersøkt for bakterier ved dyrking på flere vekstmedier. Bakterier ble ikke påvist.

### Undersøkelse for piscint orthoreovirus

Piscint orthoreovirus (PRV) er årsak til sykdom hos flere arter laksefisk og infiserer blant annet røde blodlegemer, som potensielt kan gi anemi. Tre fisk med utviklet hemorragisk smolttsyndrom ble undersøkt for piscint orthoreovirus (PRV-1 og PRV-3) ved hjelp av real time RT-PCR. Virus ble ikke påvist.



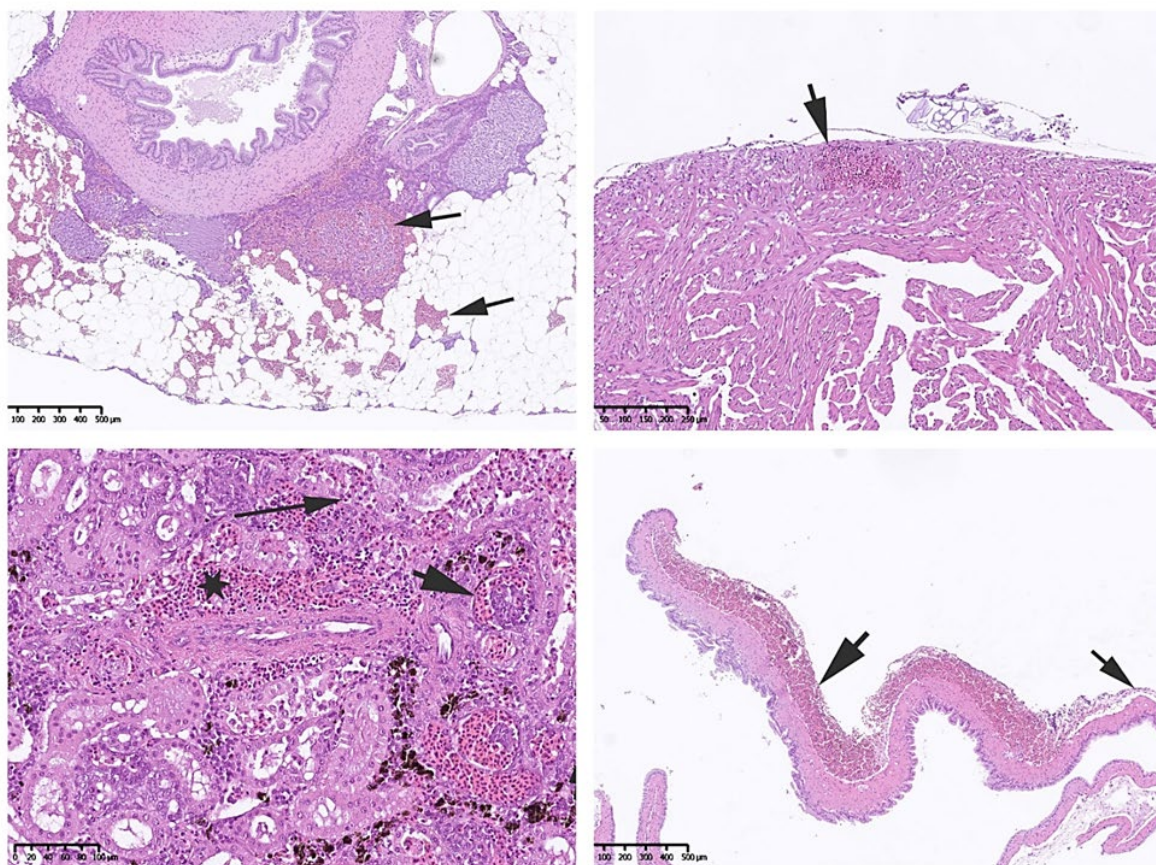
Figur 5.3. Fisk i forsøk AP2 med velutviklet hemorragisk smoltsyndrom (HSS). Det er synlige blødninger i fettvevet i bukhole, i skjelettmuskulatur, i gjellene og på hjertet. Gjellene er lyse som tegn på anemi.

### Vekt

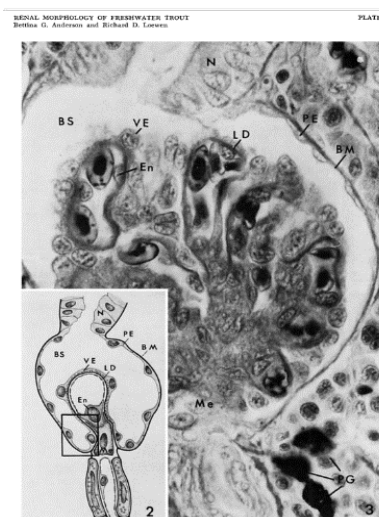
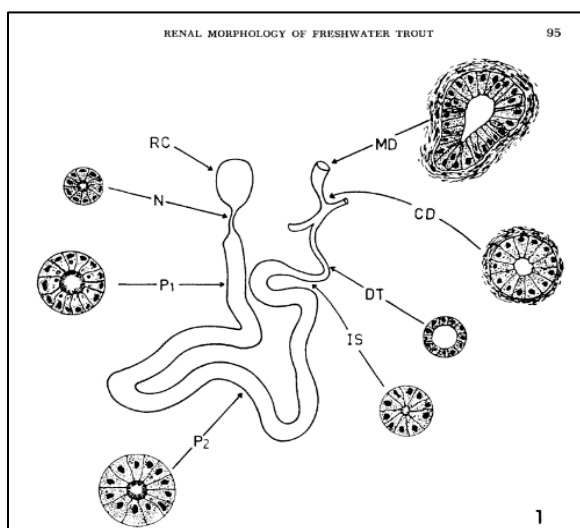
I forsøket ble HSS påvist på fisk fra 90-270 g. Av HSS-fisk funnet ved ordinære uttak veide 68 % (15/22) tilsvarende (en fisk) eller over medianvekten for fisken i det samme karet (= samme uttak). I 10 av de 16 uttakene der HSS ble påvist var denne fisken størst og/eller nest størst. Både fisk med moderat til velutviklet HSS (4/6) og fisk med mild HSS (7/16) var størst/nest størst i sine respektive uttak. Sammenhengen mellom å ha HSS og være størst/nest størst i uttaket var signifikant ( $p = 0,002$ ).

### Hematokrit

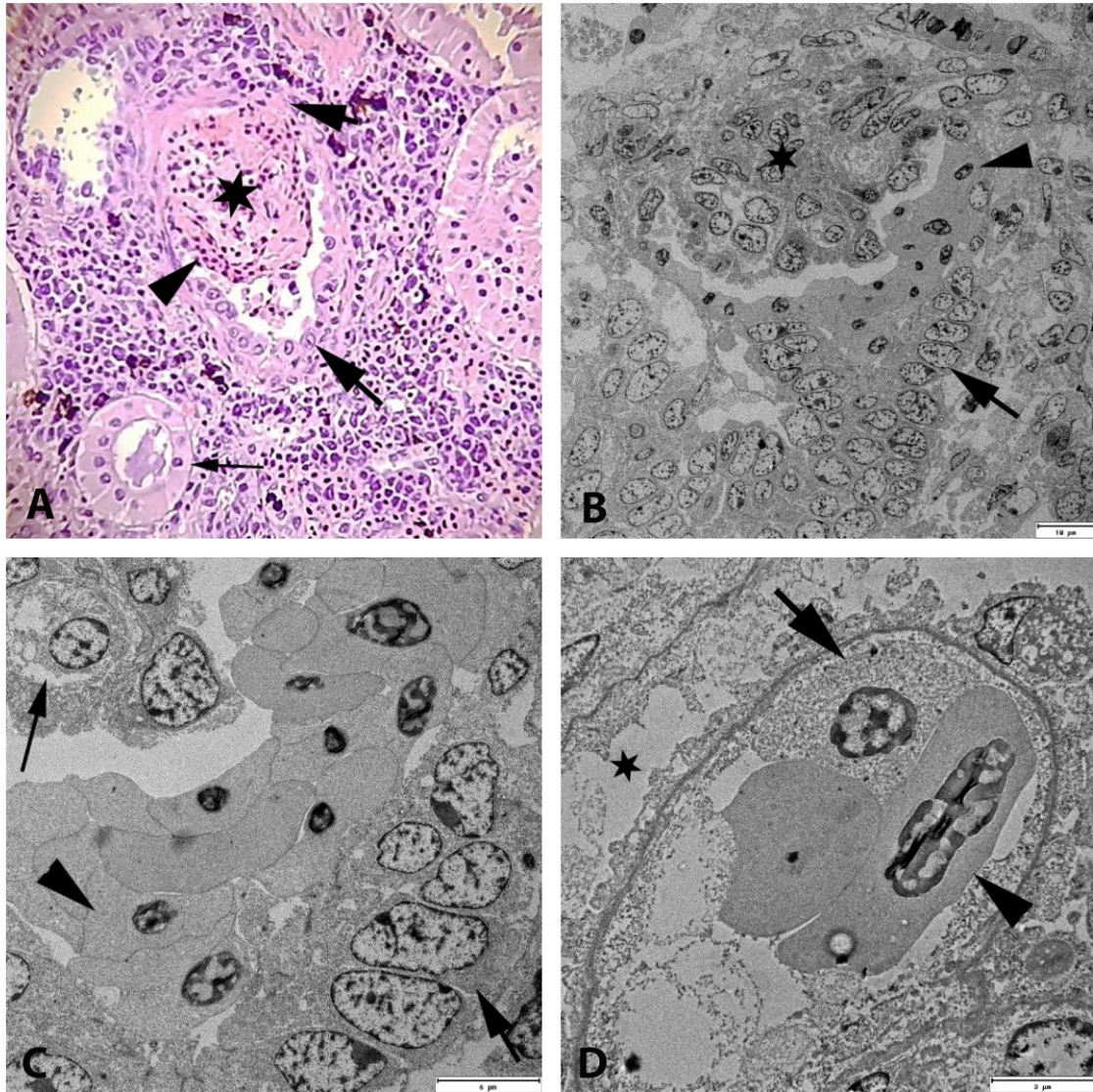
Fisk med HSS i de ordinære prøveuttakene hadde en hematokrit (Hk) som varierte fra 0 (svimer med velutviklet HSS) til 55 % (klinisk frisk fisk med mild HSS). En av de selvdøde fiskene med HSS hadde en hematokrit på 4 %. Gjennomsnittet for individer med HSS score 1 var 37,3 % (SD  $\pm$  8,6), mens gjennomsnittet for fisk med score 2 og 3 var 25,4 % (SD  $\pm$  12,5), forskjellen var signifikant ( $p < 0,05$ ) (t-test). Gjennomsnitt for alle individene uten påvist HSS var 41 % (SD  $\pm$  8,2) og signifikant høyere enn fisk med mild HSS ( $p < 0,05$ ) (ensidig t-test).



Figur 5.4. Vevsbilder (histopatologi) av fisk i forsøk AP2 med velutviklet hemorragisk smoltsyndrom (HSS). Utbredt blødning i bukhulefettet omkring tarmene og i organ som ligger her (øverst til v, piler), blødning i hjertekammerets ytre kompakte muskel (øverst til h, pil), blødninger i nyret (nederst til v, kort pil: blod i hulrommet rundt glomerulus, lang pil: blod i utførsels ganger for urindannelsen, asterisk: blødning til vevet omkring nyrets utførselssystem), blødning i svømmeblærevæggen (nederst til h, stor pil: blødning i ytterveggen av svømmeblæra, liten pil: normal svømmeblærevegg)



Figur 5.5. Skjematisk tegning av nefron hos laksefisk (ørret). Nefronet er en kanal for urindannelsen i nyret, som starter ved glomerulus (RC) der blod filtreres til preurin, og ender i samlerør før urinleder og urinblære. De ulike tverrsnittene viser hvordan kanalen endrer utforming pga. ulike oppgaver for dannelsen av urin. I bakre halvdel av laksefisknyret er det et nettverk av slike kanaler. (Etter Anderson et al. 1975)



Figur 5.6. Blødning i Bowmans rom. Histopatologi som viser blod (pilhode) i Bowmans rom omkring glomerulus (asterisk). Området der blodkar går til glomerulus (kort pil) og første del av utførselsgangen for preurin (proximale tubulus) (lang pil). Tynn pil viser tverrsnitt av proximal tubulus (HE) (A). TEM av røde blodlegemer (pilhode) omkring glomerulus (asterisk). Pil viser proximal tubulus (B). Nærbilde der pilhode viser røde blodlegemer, tynn pil viser kapillar (liten blodåre) i glomerulus og kort pil viser tubulusepitel (C). Kapillar i glomerulus med rødt blodlegeme (pilhode) og endotelselle (pil). Asterisk viser Bowmans hulrom for preurinfiltratet fra kapillarene (D).

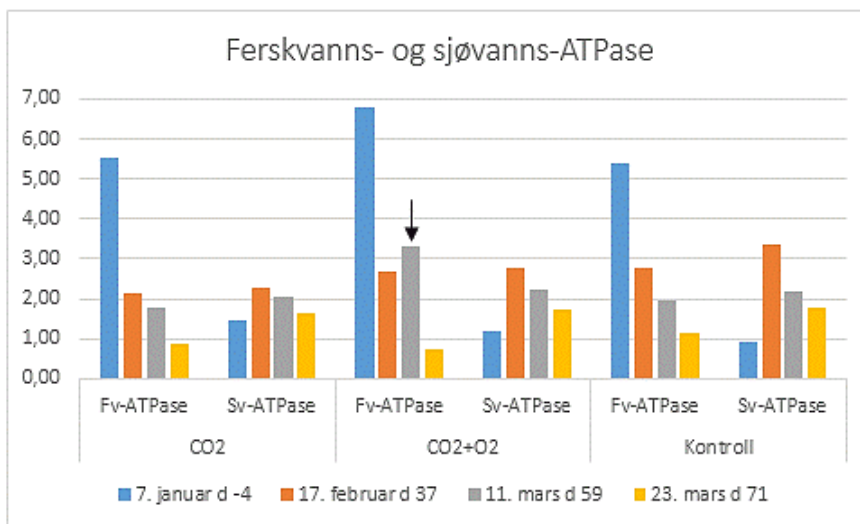


## Hormonstatus, T3 og T4

I forkant og i forbindelse med smoltifisering er det en økning i endokrin aktivitet og sentralt her er thyroideahormonene T4 (thyroksin) og T3 (trijodthyronin). Begge hormonene produseres i thyroidea (skjoldbruskkjertelen), men mesteparten av T3 dannes i vev fra T4. Det foreligger individdata for plasmanivået av hormonene T3 og T4 fra de fleste individene i midt- og sluttuttak i ferskvann. Av disse var det 14 fisk med HSS, fire fra midtuttaket i ferskvann (tre for T4) og ti fra sluttuttaket før overgang til sjøvann. For T3 var det ikke noe påfallende utslag sammenlignet med fisk der HSS ikke var påvist (en fisk lå litt lavt). For T4 varierte nivået fra å tilsvare annen fisk i sine grupper til svært høyt nivå. Dette ble målt i midtuttaket i karet med den høyeste gjennomsnittsverdien av T4 (25,2 ng/ml), det ene CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-repliket der det var en opphopning av fisk med HSS (Kapittel 4). Forskjellen i dette karet var signifikant (t-test) sammenlignet både med det andre repliket (gj.sn. 7,8, p < 0,05) og kontrollgruppen (gj.sn. 6,3, p = 0,001).

## Smoltifisering

Det ble foretatt analyse av genuttrykk for ferskvanns-ATPase og sjøvanns-ATPase (SmoltVision) på prøver av gjellelev (n= 10 per forsøksgruppe) ved oppstart og gjennom eksponeringsperioden i ferskvann (figur 5.7). Ved midtuttaket (d 37) var det i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen større variasjon og færre individer enn i de to andre gruppene (4/10 mot 7/10), som hadde et dominerende uttrykk av sjøvanns-ATPase og regnet for å være sjødyktig. Det ble også målt høyt nivå av ferskvanns-ATPase i denne gruppen ved uttak dag 59 (se pil i figur 5.7) sammenlignet med de andre gruppene (ikke signifikant). Det høye nivået skyldtes to individer med velutviklet HSS i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-repliket med en opphopning av fisk med HSS. Det var ellers ikke noe spesielt utslag for fisk med mild HSS (seks fisk, to fisk midtuttak og fire fisk sluttuttak fv) eller moderat HSS (to fisk, sluttuttak fv).



Figur 5.7. Relativt genuttrykk (gjennomsnittsverdier) for hhv. ferskvanns- og sjøvanns-ATPase (SmoltVision) over tid i forsøk 2. Det er undersøkt ti fisk per eksponeringsgruppe i hvert uttak. Ved uttak dag 59 ble det målt høyt nivå av ferskvanns-ATPase i CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-gruppen (pil).

## 5.4 DISKUSJON

Under de eksperimentelle forholdene i forsøk 2 var det fisk som var døende eller døde med velutviklet HSS. De makro- og histopatologiske funnene samsvarer med resultatet av tilsvarende undersøkelser gjort i feltstudien beskrevet i kapittel 2 og slik sykdommen ble beskrevet for første gang fra Skottland av Rodger og Richards, 1998. Sykdommen er karakterisert ved en generalisert blødningstendens som kan være svært uttalt. Til forskjell fra blødninger ved sepsis, dvs. alvorlig infeksjon i blodet, er det typisk å finne blod i nyrets utførselssystem ved HSS. Denne forandringen kan ofte finnes tidlig i sykdomsutviklingen. Vi fant ikke blødninger utenfor tubuli ved mild og moderat grad av HSS. Ved den histopatologiske undersøkelsen ble det funnet blod i alle deler av nyrets utførselssystem, også der nefronet starter, omkring glomeruli. Påvisning av blod i urinrommet kan tyde på at en forandring tidlig i sykdomsutviklingen er lekkasje fra de små blodkarene i nyrets glomeruli. Det er ikke avklart hva som forårsaker lekkasjen fra blodkarene.

I motsetning til i den eksperimentelle studien i forsøk 1 der det bare var en ubetydelig forekomst av HSS blant forsøksfisken og helst milde funn, var det i forsøk 2 fisk med moderat til uttalt HSS i alle grupper. Det var også, av ukjent grunn, en opphopning i ett av karene (CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-repliket). Det er derfor grunn til å tro at det var risikofaktorer til stede i det siste forsøket, som manglet eller var mindre fremtredende i forsøk 1.

### Hematokrit

Typisk for klinisk syk fisk med HSS under naturlige forhold er anemi. Dette er synlig ved obduksjon som bleike gjeller/indre organ og tynt, lyst blod, og kan måles som redusert prosent røde blodlegemer i blodet (hematokrit) (Rodger og Richards, 1998, diagnostiske funn ved Veterinærinstituttet, Kapittel 2- Feltstudien). I den eksperimentelle studien var hematokrit signifikant redusert hos fisk med moderat til uttalt HSS sammenlignet med fisk med bare milde HSS-funn. Fisk med mild HSS hadde noe lavere Hk enn fisk der HSS ikke var påvist. Ekstremt lave hematokritverdier (0 og 4 %) ble bare målt hos fisk som var klinisk syk/død med velutviklet HSS, mens fisk i bedre klinisk tilstand hadde høyere hematokritverdier (20-32 %). Dette kan tyde på at det oppstår en forholdvis rask total hematologisk/sirkulatorisk kollaps i den terminale fasen av sykdommen.

### Vekt

Som rapportert i de første beskrivelsene av hemorragisk smoltsyndrom (Rodger og Richards, 1998, Nylund *et al.* 2003) er det også i forsøksstudien en tendens til at det er stor, fin fisk som er affisert. En overvekt av fisk med HSS var størst eller blant de største i sine grupper ved uttak og sammenhengen var statistisk signifikant. Det var imidlertid også individer med HSS som hadde lavere vekt enn medianen i sine grupper.

### Smoltifisering

Hemorragisk smoltsyndrom har en tendens til å oppstå i ferskvann i smoltifiseringsperioden (Hans Olav Djupvik, veterinær, pers. med.), som også er den perioden sykdommen ble utviklet i vår studie. Det er derfor en oppfatning av at HSS kan knyttes til forstyrrelser i smoltifiseringsprosessen. I studien var det påfallende funn som angikk HSS-fisk og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-repliket med en opphopning av fisk med HSS. Dette gjaldt både for nivå av thyroideahormonet T4, en indikator for smoltifiseringsprosessen, og for genuttrykket for gjelleaktiviteten av smoltifiseringsmarkørene ferskvanns- og sjøvanns-ATPase. Tolkningen av funnene i forhold til utvikling av HSS er usikker, men kan indikere at forstyrrelser ved smoltifiseringen er av betydning. Utviklingen av HSS brytes ved overgang til sjøvann, som indikerer at miljøforhold som sannsynligvis ligger til grunn for lidelsen endres.

## Smitte ikke påvist

Det kan ikke utelukkes at en opphopning av sykdomstilfeller i et avgrenset system som en fisketank også kan oppstå pga. en smittsom mikrobe. Slike er ikke påvist tidligere (Rodger og Richards, 1998). I denne studien var det ingen tegn til bakterie- eller PRV-infeksjon. Det histopatologiske bildet var heller ikke typisk for en septikemisk tilstand.

## Reproduserbar laboratoriemodell

Under de eksperimentelle forholdene ble HSS i de ordinære prøveuttakene påvist i 12 % (23/196) av fiskene og i alle de tre gruppene, også i kontrollgruppen. Og det var ingen signifikant forskjell i forekomsten mellom forsøksgruppene. Det var imidlertid en opphopning i det ene CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-repliketet i de ordinære prøveuttakene og det var også her de aller fleste døende og døde fiskene med HSS ble påvist. Det var ingen ytre forhold i laboratoriet som tydet på at dette ene CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>-repliketet skulle skille seg ut, f.eks. at fisken i forsøksstanken var eksponert for støy eller annen type stress. Det er imidlertid usikkert om eksponeringsforholdene med kombinasjonen hyperkapni og hyperoksi er den utløsende faktoren for denne opphopningen, men det kan ikke utelukkes at dette kan ha hatt betydning sammen med andre underliggende forhold for fisken i dette karet.

Vi har ikke oppnådd å etablere reproduserbare betingelser for å provosere fram HSS. Men det kan likevel være faktorer gitt i forsøk 2 som er verdt å gå videre med, og spesielt kombinasjonen av hyperoksi+hyperkapni.

## 5.5 HEMORRAGISK SMOLTSYNDROM OG NEFROKALSINOSE

NK og HSS betraktes som to separate tilstander, men i felt er det observert at de kan opptre samtidig og i samme fisker eller at NK følger etter episode med HSS eller omvendt. I prosjektet er det både i feltmateriale og i eksperimentelle studier undersøkt om de samme fiskene som hadde hemorragisk smoltsyndrom også fikk påvist nefrokalsinose eller om den ene tilstanden fulgte den andre, og da spesielt om HSS bidro til utviklingen av NK.

### Assosiasjon mellom å ha både HSS og NK

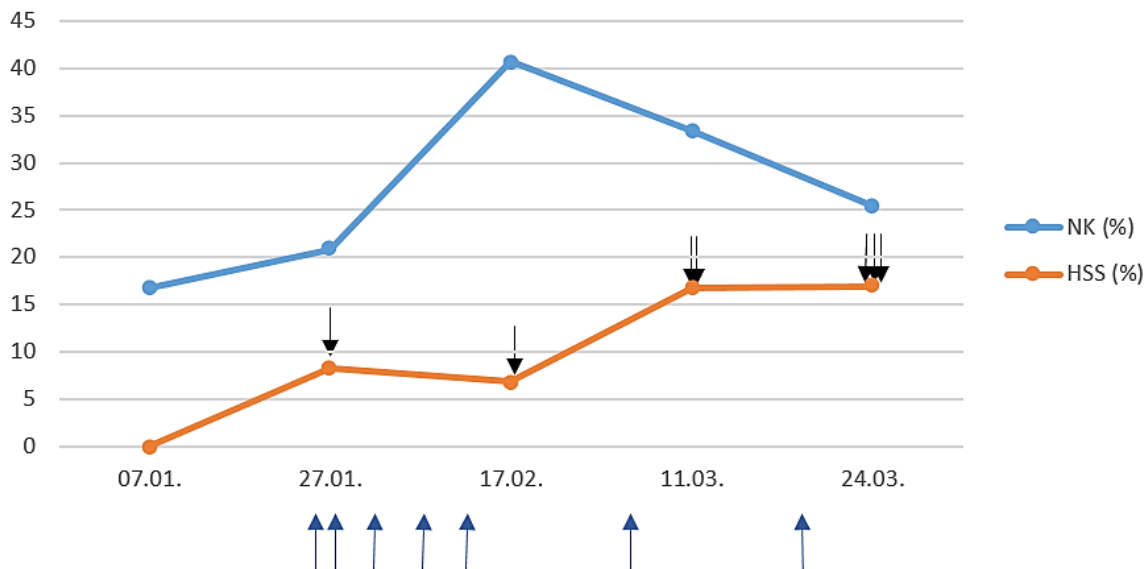
I løpet av 2019 og 2020 ble det tatt ut 190 nyreprøver over en seks måneders periode fra fisk i et settefiskanlegg (se Kapittel 2, anlegg A). Av 22 fisk med HSS hadde ti av disse også NK (i alt 39 med NK). Selv om 12 HSS fisk ikke hadde NK og 29 fisk bare hadde NK var assosiasjonen mellom å ha HSS og NK signifikant. Det samme gjaldt også samlet for alle de seks settefiskanleggene som ble fulgt i Arbeidspakke 1 (Kapittel 2). Av totalt 561 nyreprøver, hadde 42 av de 60 fiskene med HSS også NK (i alt 200 med NK) og denne assosiasjonen var signifikant. Det var likevel 158 individer med NK uten HSS og 18 fisk med HSS uten NK.

I AP2 i den eksperimentelle studien forsøk 2 ble det i ferskvannsfasen undersøkt 220 fisk. Av de 23 fiskene med HSS hadde 14 også NK. Selv om 49 NK positiv fisk ikke hadde HSS og 9 HSS positiv fisk ikke hadde NK var det en signifikant assosiasjon mellom å ha både HSS og NK.

I løpet av forsøksperioden var det totalt 14 fisk som fikk påvist moderat/uttalt HSS (sju i ordinære prøveuttak og sju døende/døde i tillegg). Ni av disse individene fikk også påvist NK, men overveiende bare milde funn (åtte i mild grad og én moderat grad).

## Utvikling av HSS og NK over tid

Figur 5.8 viser utviklingen over tid av nefrokalsinose og HSS i ferskvannsprøvetiden i den eksperimentelle studien (forsøk 2). Mens utvikling av NK skjer forholdsvis raskt og har nådd toppen etter ca. fire uker, er det økning i antall fisk med HSS helt fram til avslutningen av ferskvannsprøvetiden. Det er også til dels betydelig lavere prevalens av HSS gjennom hele perioden.



Figur 5.8. Forekomsten av HSS og NK over tid gjennom ferskvannsprøvetiden. Svart pil: Antall fisk med HSS grad 2 og 3 påvist ved ordinære prøveuttak. Blå pil: HSS påvist i døende/død fisk i tillegg til ordinære uttak.

## Sammenheng mellom HSS og NK

Studien av utviklingen av HSS og NK over tid hos fisk både i felt og under eksperimentelle betingelser støtter ikke hypotesen om at hemorragisk smoltsyndrom bidrar til utviklingen av NK eller omvendt. Tilstandene opptrer uavhengige av hverandre i den forstand at de har ulikt utviklingsmønster gjennom de siste månedene før overgang til sjø og det er påvist mye lavere insidens av HSS enn NK i undersøkelsesmateriale. Men selv om vi ser NK hos fisk uten HSS og HSS hos fisk uten NK, ble det påvist en statistisk signifikant assosiasjon mellom tilstandene, dvs. at det var en sannsynlighet utover det tilfeldige at fisk med HSS også kunne ha NK. Det er derfor indiksjoner på at det finnes en eller flere sammenfallende faktorer som bidrar til at fisk kan få HSS eller NK eller begge deler samtidig.

## 6. METABOLSKE OG FYSIOLOGISKE FORANDRINGER

---

Av: Sofie Charlotte Remø<sup>3</sup>, Per Gunnar Fjellidal<sup>3</sup>, Erik J. B. Michelsen, Camilla Diesen Hosfeld<sup>1</sup>, Sveinung Fivelstad<sup>1</sup>, Anne Berit Olsen<sup>2</sup>, Arve Nilsen<sup>2</sup>

### 6.1 INNLEDNING

Nefrokalsinose (NK) er en lidelse der kalsium akkumulerer i nyrene og det kan finnes mineralforekomster (utfellinger) i utskillelsesvevet i nyre (Smart et al. 1979), som resulterer i skade i tubuli og redusert nyrefunksjon (Sayer et al., 2004). Hos mennesker som i fisk er NK regnet som en lidelse som kan ha flere og sammensatte årsaker, og er assosiert med tilstander og sykdommer som fører til hyperkalsemi (økt konsentrasjon av kalsium (Ca) i plasma) og hyperkalsiuri (økt utskillelse av kalsium i urinen) (Dickson og Sayer, 2020). NK er også relatert til «metastatisk kalsifisering» som er definert som deponering av kalsiumsalt i vev som følge av hyperkalsemi og høy pH (Shavit et al., 2015). Flere studier har koblet utvikling av NK til langvarig CO<sub>2</sub> eksponering hos både laks og regnbueørret (Bokkappittel, Fivelstad et al., 2020).

Effektene CO<sub>2</sub> har på fisk har først og fremst blitt undersøkt i blodet med fokus på syre-base respons og regulering. Som beskrevet i større detalj i foregående kapitler vil pCO<sub>2</sub> i plasma øke proporsjonalt med pCO<sub>2</sub> i vannet, noe som fører til reduksjon av pH i plasma. Dette fører igjen til økt konsentrasjon av bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) for å opprettholde normal pH i plasma. Det tar som regel 2-7 dager før denne prosessen gjenoppretter og stabiliserer normal plasma pH. Den forhøyede HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> konsentrasjonen fører til redusert plasma klorid (Cl<sup>-</sup>) for å holde summen av negative ioner konstant. Både i dette prosjektet og i tidligere studier har utvikling av NK blitt relatert til forstyrrelser i mineralhomeostasen. Parr eksponert for høy CO<sub>2</sub> hadde forhøyet kalsiumkonsentrasjon i nyre (Fivelstad et al., 2003), og flere studier har vist forandringer i beinmineralisering (Gil Martens et al., 2006, Drabikova et al., 2023). En tidligere studie har også vist forandringer i forholdet mellom kalsium og fosfor (Ca:P ratio) i nyre hos postsmolt eksponert for høy CO<sub>2</sub> i sjøvann (Remø et al., in prep), men i denne studien ble det ikke undersøkt om disse forandringene kunne relateres til utvikling av NK på individnivå.

CO<sub>2</sub>-eksponering fører i tillegg til en rekke fysiologiske og metabolske tilpasninger som kan redusere vekst og velferd (Fivelstad et al., 2020). Hos fisk har det blant annet blitt vist at forhøyet CO<sub>2</sub> gir redusert tilvekst og kondisjonsfaktor (Review av Thorarensen og Farrell, 2011; Fivelstad et al., 2020), forandringer i sammensetning av frie aminosyrer i muskel (Waagbø et al., 2008), akkumulering av oksidasjonsprodukter i lever som indikasjon på oksidativt stress, forandring i konsentrasjonen av histidin-derivatene anserin og karnosin i muskel og i konsentrasjonen av N-Acetylhistidin (NAH) i hjerte (Remø et al., in prep). Histidin og histidinforbindelser har en rekke funksjonelle egenskaper, deriblant som bufferkomponenter (Abe, 2000). I parr eksponert for økende CO<sub>2</sub> konsentrasjoner ble det også sett en økning i bufferkapasitet i hjerte, mens bufferkapasiteten i muskel ble redusert (Remø et al., in prep).

Ett av målene i dette prosjektet var derfor å undersøke om flere av de metabolske og fysiologiske tilpasningene til forhøyet CO<sub>2</sub> kunne relateres til utvikling av NK og HSS i fisk fra forsøkene beskrevet i kapittel 3 og 4.

## 6.2 METODE

Utvidede analyser ble gjort på materiale fra de to forsøkene beskrevet i foregående kapitler for å undersøke mulige underliggende metabolske og fysiologiske forandringer i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og individer med påvist NK og HSS. Kort oppsummert ble fisk fra fire ulike anlegg (A, C, G og H) i forsøk 1 eksponert for ~ 16 mg/L CO<sub>2</sub> i seks uker i 9°C ferskvann bufret med sjøvann for å hindre forsuring av vann (Kapittel 3). I forsøk 2 ble fisken eksponert for ~ 23 mg/L CO<sub>2</sub> og ~ 22 mg/L CO<sub>2</sub>+ 125% O<sub>2</sub> i 10 uker i 5°C ferskvann bufret med bikarbonat (Kapittel 4). I forsøkene ble det brukt et standard lysregime for årtidsuavhengig smoltproduksjon, der fiskene forkant av forsøkene var gitt vintersignal (LD 12:12) og deretter kontinuerlig lys (LD 24:0) ved oppstart av forsøkene for å indukere smoltifisering.

Ved prøveuttak ble det tatt prøver av nyre til histologi (resultat beskrevet i kapittel 3 og 4) og bestemmelse av mineralinnhold. I tillegg ble det tatt prøver av hjerte, lever, muskel og rygggrad. I forsøk 1 ble det funnet svært få fisk med NK mens det i forsøk 2 ble funnet NK hos mellom 30-70% av den CO<sub>2</sub> eksponerte fisken ved ulike prøveuttak. Det ble derfor i hovedsak fokusert på videre analyser fra forsøk 2 for å kunne undersøke både hvordan CO<sub>2</sub> eksponering påvirket fisken og mulige forskjeller mellom fisk med og uten NK i de ulike gruppene.

### Biokjemiske analyser og velferdsevaluering

Bestemmelse av mineralinnhold i nyre ble gjort med ICPMS, som beskrevet av Julshamn et al., 2007. Malondialdehyd (MDA) i lever ble undersøkt med HPLC, og glutation (GSH) i lever ble analysert med et kommersielt kit (Prod. No. GT40, Oxford Biomedical Research, Oxford, UK) som beskrevet av Hamre et al. (2022). Hjerte NAH ble analysert med revers-fase HPLC (Waters Corporation), og frie aminosyrer i muskel ble bestemt ved ninhydrin deteksjon med Biochrom (Biochrom Limited) som beskrevet i Remø et al. (2014). Katarakt ble undersøkt med en håndholdt spaltelampe (HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Herrsching, Germany). Hver linse ble gitt en score mellom 0-4, som gir en total score på 0-8 per fisk, etter metoden beskrevet av Wall og Bjerkås (1999). Røntgenbilder ble tatt med et Direct Radiology System (Canon CXDI-410C Wireless, CANON INC., Kawasaki, Japan) og Portable X-ray Unit Hiray Plus (Model Porta 100 HF, JOB Corporation, Yokohama, Japan). Mekaniske egenskaper i ryggvirvel ble undersøkt ved siste uttak i ferskvann i forsøk 2. Fra hvert individ ble tre ryggvirvler (V42-44) fra haleregionen dissekert. Hver ryggvirvel ble målt morfometrisk og analysert for mekaniske egenskaper (Drabikova et al., 2022).

### Statistikk

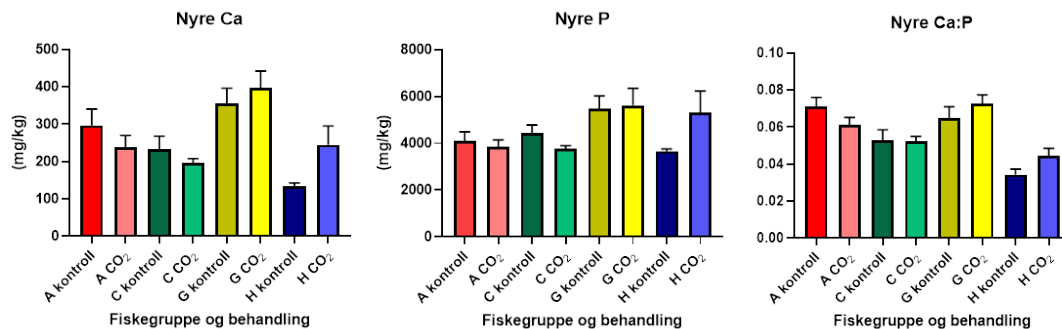
I forsøk 1 ble effekt av CO<sub>2</sub> eksponering undersøkt for hvert anlegg (nested en-veis ANOVA/ikke-parametriske tester, n=2 kar per behandling), i tillegg til kombinerte effekter av CO<sub>2</sub> på fisk fra alle anlegg (n=8 kar per behandling). I forsøk 2 ble effekt av CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> eksponering undersøkt med nested (kar) en-veis ANOVA/ikke-parametriske tester, n=2 kar per behandling). Korrelasjoner ble undersøkt med Spearman rank. Statistiske analyser ble gjort i Statistica 13.4.0.14 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Homogenitet i varians ble undersøkt med Levene's test. Tukey HSD post-hoc test ble gjort ved p-verdier <0.05. Figurer ble laget i GraphPad Prism (version 8.4.3 (686) San Diego, California USA).

## 6.3 RESULTAT

### Akkumulering av kalsium i nyre

#### Forsøk 1

CO<sub>2</sub>-eksponering førte ikke til akkumulering av kalsium i nyre for de ulike fiskegruppene i forsøk 1. Gjennomsnittlig konsentrasjonen av kalsium i nyre for de ulike gruppene varierte mellom 133 og 398 mg/kg, fosfor varierte fra 3663 og 5623 mg/kg, og ratio mellom kalsium og fosfor (Ca:P) var mellom 0,03-0,07 (Figur 6.1).



Figur 6.1. Konsentrasjon av kalsium (Ca), fosfor (P) og ratio mellom kalsium og fosfor (Ca:P) i nyre ved siste uttak i ferskvann (42 dagers eksponering) i forsøk 1. Ingen forskjeller ble funnet mellom kontrollfisk og CO<sub>2</sub> eksponert fisk fra de ulike anleggene (A, C, G og H).

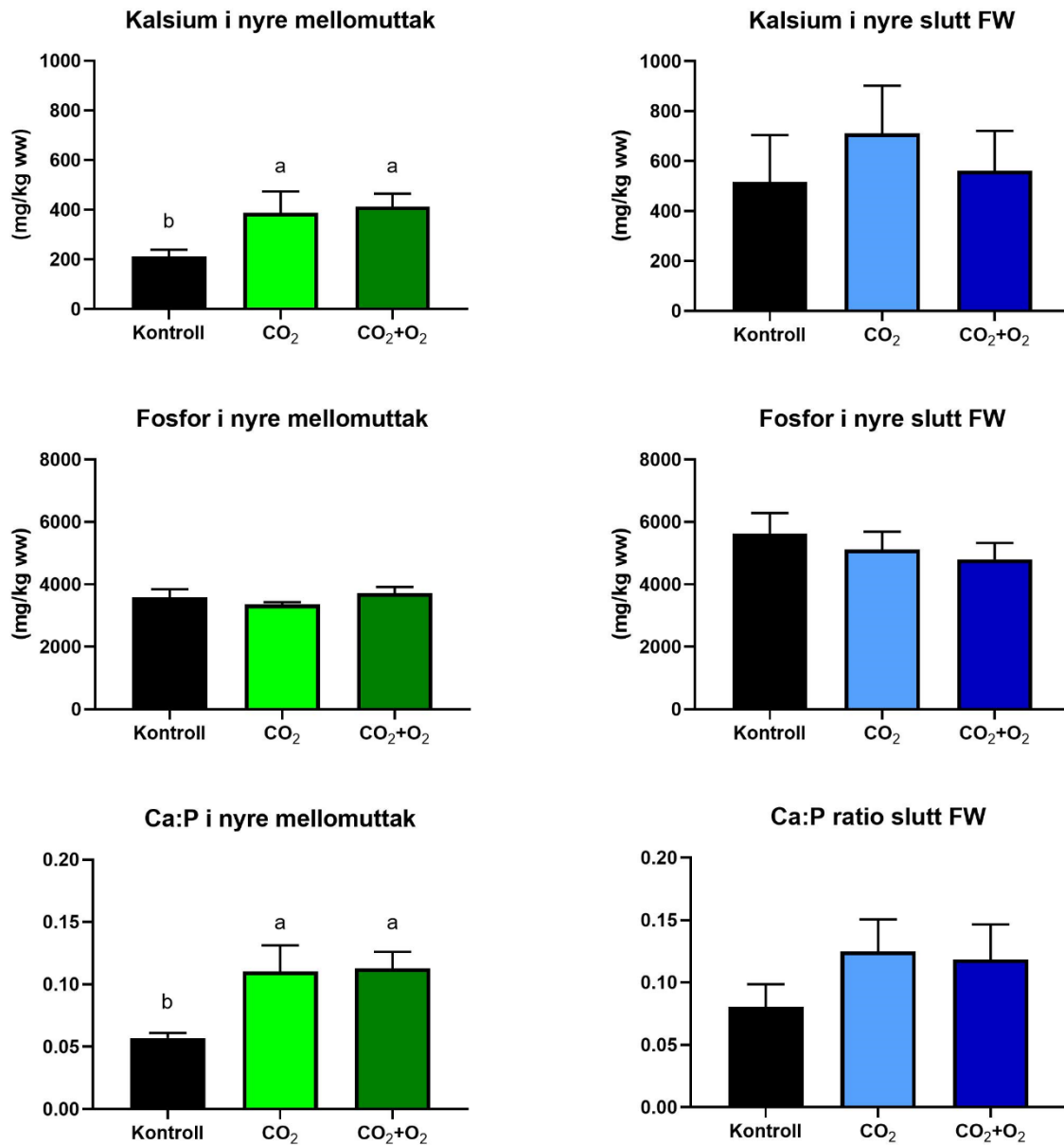
#### Forsøk 2

Det ble funnet økt kalsiuminnhold i nyre hos fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> sammenlignet med kontroll, med konsentrasjoner på henholdsvis 387±86 og 414±51 mot 212±27 mg/kg i kontrollfisken (Figur 6.2). Det var ingen forskjeller i konsentrasjonen av fosfor, med gjennomsnittlige konsentrasjoner på 3579±269 i kontrollfisken og 3355±78 i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og 3715±199 i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub>. Ved mellomuttaket var også ratio mellom kalsium og fosfor (Ca:P) signifikant høyere i gruppene eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>, med en økning fra gjennomsnittlig 0,06±0,004 i kontrollfisken til 0,11±0,02 i de CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> eksponerte fiskene. Ved mellomuttaket ble det funnet ni fisk med NK score 2 og 15 fisk med NK score 1 (Kapittel 4). Det var en signifikant korrelasjon mellom Ca:P ratio og NK score (r=0.45), med ratio på 0,08±0,01 i fisk uten NK (score 0), 0,11±0,01 i fisk med score 1 og 0,13±0,03 i fisk med score 2. Det var ingen korrelasjon mellom Ca i plasma og Ca i nyre.

Ved slutten av eksponeringsperioden var den gjennomsnittlige konsentrasjonen av både kalsium og fosfor i nyre høyere enn ved mellomuttaket, men det var ikke lenger forskjeller i konsentrasjon mellom fisk gitt de ulike behandlingene. Konsentrasjonen av kalsium var 518±186, 711±190 og 561±160 mg/kg, og konsentrasjonen av fosfor var 5620±672, 5115±575 og 4800±530 mg/kg, og Ca:P ratio 0,08±0,02, 0,12±0,03 og 0,12±0,03 i henholdsvis kontroll, fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> (Figur 6.2).

Innholdet av kalsium, fosfor og Ca:P ratio ble også vurdert i relasjon til forekomst og alvorlighet av NK, der en signifikant, men moderat korrelasjon ble funnet mellom NK score og Ca:P ratio (r=0,36). Fisk med score 2 (n=5) ved sluttuttaket, hadde høyere konsentrasjon av kalsium i nyre (gjennomsnitt 1400 mg/kg) mot 524 og 533 mg/kg, og gjennomsnittlig Ca:P ratio på 0,26±0,2 mot 0,09±0,08 og 0,11±0,08

i fisk uten NK (score 0) eller NK score 1. Det var ingen korrelasjon mellom Ca i plasma og Ca i nyre ved sluttuttaket i ferskvann.



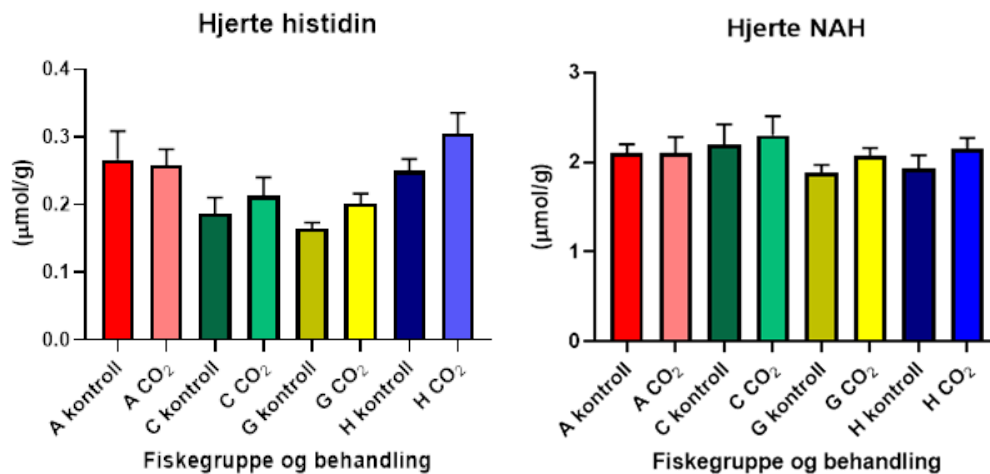
Figur 6.2. Konsentrasjon av kalsium (Ca), fosfor (P) og ratio mellom kalsium og fosfor (Ca:P) i nyre hos fisk ved mellomuttaket (37-38 dagers eksponering) og sluttuttaket i ferskvann (72-73 dagers eksponering) i forsøk 2. Signifikante forskjeller er vist med ulike bokstaver (a, b).



## Bufferkapasitet – histidinforbindelser

### Forsøk 1

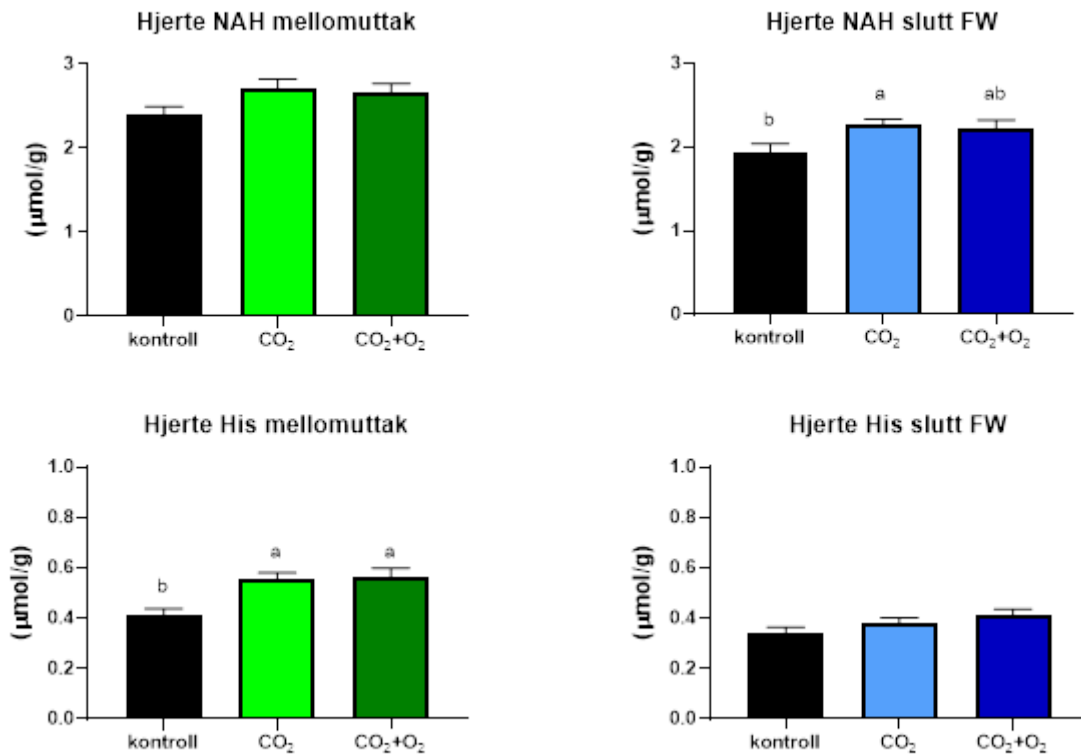
Konsentrasjonen av histidin (His) og N-Acetylhistidin (NAH) ble undersøkt i hjerte ved siste prøveuttak i ferskvann. CO<sub>2</sub> eksponering førte ikke til forandringer i konsentrasjonen av histidin eller NAH (Figur 6.3).



Figur 6.3. Konsentrasjon av histidin og N-acetylhistidin (NAH) i hjerte ved siste uttak i ferskvann (42 dagers eksponering) i forsøk 1 (snitt  $\pm$  SE).

### Forsøk 2

I mellomuttaket var konsentrasjonen av histidin i hjerte høyere hos fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> enn i kontrollfisk (p=0,001), mens det ved sluttuttaket var noe økning i de samme gruppene, men ikke signifikant (p=0,1) (Figur 6.4). Konsentrasjonen av N-Acetylhistidin (NAH) i hjerte var noe høyere i de CO<sub>2</sub> eksponerte gruppene i mellomuttaket, men det var ikke signifikante forskjeller (p=0,1), mens det ved siste uttaket i ferskvann var signifikant høyere i fisk eksponert for bare CO<sub>2</sub>, men ikke CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> (p=0,04). Ratio mellom NAH:His var høyere i kontrollfisk enn i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> ved mellomuttaket (p=0,004), mens det ved sluttuttaket ikke var forskjeller i ratio (p=0,3). Det var ingen korrelasjon mellom individuell NK score eller HSS med NAH, His eller NAH:His ratio ved noen av uttakene.



Figur 6.4. Konsentrasjon av histidin og N-acetylhistidin (NAH) i hjerte (snitt  $\pm$  SE) ved mellomuttaket (37-38 dager eksponering) og sluttuttaket i ferskvann (72-73 dagers eksponering) i forsøk 2. Signifikante forskjeller er vist med ulike bokstaver (a, b).

### Frie aminosyrer i muskel

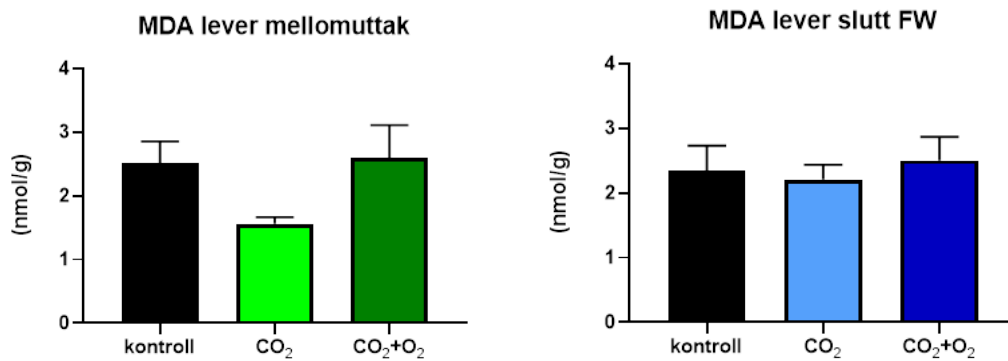
Frie aminosyrer ble analysert i muskel ved mellomuttaket og sluttuttaket i forsøk 2. Ingen forskjeller ble sett i konsentrasjonen av anserin og karnosin. Ved mellomuttaket var det forhøyet histidin i gruppene eksponert for CO<sub>2</sub>, mens det ikke var signifikant høyere ved sluttuttaket. Ved begge uttak ble det funnet forskjeller i konsentrasjonen av treonin, citrullin, cystathionin og leucin. I mellomuttaket var det i tillegg sett forandringer i aspartat, serin, glutaminsyre, prolin, alanin, fenylalanin og ornitin. Ved sluttuttaket var det lavere konsentrasjon av valin og høyere konsentrasjon av lysin (Tabell 6.1).

Tabell 6.1. Frie aminosyrer i muskel ved mellomuttaket (37-38 dager eksponering) og siste uttak i ferskvann før overføring til sjø (72-73 dagers eksponering) (snitt ± SE) i forsøk 2. Signifikante forskjeller mellom behandlingene er vist med p-verdi.

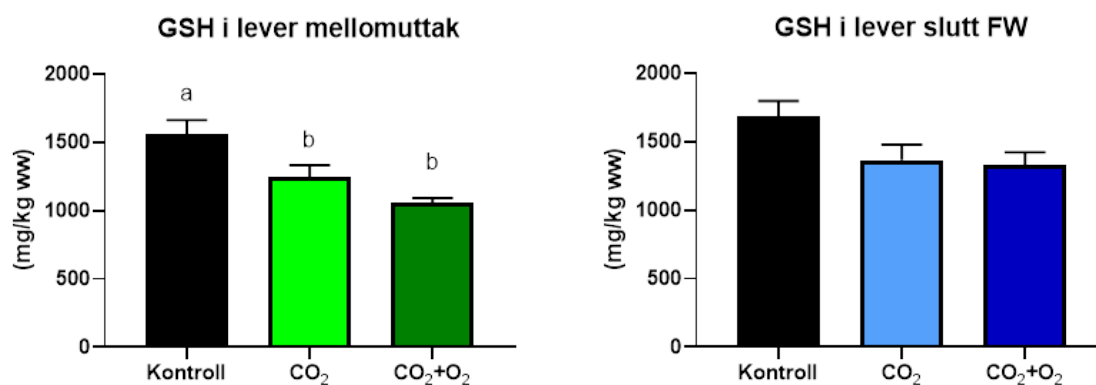
	Mellomuttak ferskvann				Sluttuttak ferskvann			
	Kontroll	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +O <sub>2</sub>	p-verdi	Kontroll	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +O <sub>2</sub>	p-verdi
Taurine	1.48 ± 0.49	1.19 ± 0.24	1.46 ± 0.26		1.05 ± 0.31	1.36 ± 0.20	0.88 ± 0.08	
O-Phosphoethanolamine	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00		0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	
Urea	1.15 ± 0.08	1.10 ± 0.09	1.26 ± 0.09		1.44 ± 0.13	1.18 ± 0.12	1.48 ± 0.09	
L-Aspartic acid	0.19 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.03	0.18 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.01	
Hydroxy-L-Proline	0.79 ± 0.04	0.69 ± 0.05	0.62 ± 0.03		0.88 ± 0.05	0.79 ± 0.04	0.81 ± 0.06	
L-Threonine	0.54 ± 0.08	0.31 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.00	0.32 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.04
L-Serine	0.66 ± 0.11	0.74 ± 0.07	0.97 ± 0.05	0.01	0.57 ± 0.07	0.52 ± 0.06	0.59 ± 0.07	
L-Glutamic acid	0.49 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.02	0.43 ± 0.05	0.40 ± 0.02	0.36 ± 0.02	
L-Glutamine	0.25 ± 0.06	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.02		0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.02	
L-Proline	0.41 ± 0.13	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.00	0.18 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.04	
L-Glycine	5.34 ± 0.23	4.87 ± 0.23	5.17 ± 0.12		5.17 ± 0.21	4.44 ± 0.18	4.53 ± 0.24	
L-Alanine	4.51 ± 0.29	3.97 ± 0.16	3.66 ± 0.09	0.01	4.34 ± 0.12	4.05 ± 0.16	3.92 ± 0.18	
L-Citrulline	0.037 ± 0.004	0.019 ± 0.002	0.020 ± 0.001	0.00	0.039 ± 0.003	0.026 ± 0.003	0.029 ± 0.002	0.01
L-Alfa-Amino-n-Butyric acid	0.100 ± 0.014	0.068 ± 0.004	0.066 ± 0.003	0.00	0.093 ± 0.006	0.072 ± 0.003	0.072 ± 0.005	0.02
L-Valine	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01		0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.02
L-Methionine	0.057 ± 0.006	0.051 ± 0.004	0.059 ± 0.003		0.033 ± 0.004	0.037 ± 0.004	0.034 ± 0.009	
Cystathionine2	0.080 ± 0.008	0.076 ± 0.006	0.053 ± 0.005	0.01	0.114 ± 0.009	0.078 ± 0.006	0.118 ± 0.014	0.04
L-Isoleucine	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.00		0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	
L-Leucine	0.26 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.05	0.23 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.003
L-Tyrosine	0.035 ± 0.004	0.040 ± 0.004	0.044 ± 0.004		0.042 ± 0.005	0.059 ± 0.005	0.044 ± 0.005	
B-Alanine	1.57 ± 0.21	1.38 ± 0.14	1.20 ± 0.06		1.99 ± 0.16	1.65 ± 0.18	2.07 ± 0.14	
L-Phenylalanine	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	
Ammonium chloride	5.14 ± 0.09	4.94 ± 0.09	5.10 ± 0.04		4.94 ± 0.08	4.73 ± 0.05	4.76 ± 0.06	
L-Ornithine	0.008 ± 0.003	0.012 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.04	0.005 ± 0.002	0.010 ± 0.004	0.007 ± 0.004	
L-Lysine	0.13 ± 0.03	0.33 ± 0.05	0.29 ± 0.03		0.13 ± 0.01	0.40 ± 0.08	0.54 ± 0.07	0.008
1-Methyl-L-Histidine	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00		0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	
L-Histidine	0.49 ± 0.11	0.62 ± 0.08	0.96 ± 0.06	0.001	0.07 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.07
Anserine	13.87 ± 0.22	13.89 ± 0.17	13.76 ± 0.17		13.66 ± 0.35	14.11 ± 0.19	13.58 ± 0.17	
Carnosine	0.34 ± 0.05	0.38 ± 0.06	0.27 ± 0.04		0.50 ± 0.12	0.61 ± 0.08	0.80 ± 0.11	
Arginine	0.037 ± 0.007	0.043 ± 0.007	0.030 ± 0.003		0.036 ± 0.004	0.059 ± 0.008	0.062 ± 0.011	

## Oksidativt stress

Som mål på oksidativt stress ble konsentrasjon av malondialdehyd (MDA), et oksidasjonsprodukt, og glutation (GSH) en endogen antioksidant, undersøkt i forsøk 2. Konsentrasjonen av MDA i lever var noe høyere i kontrollfisk og fisk eksponert for både CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> ved mellomuttaket, enn i fisk bare eksponert for CO<sub>2</sub>, men forskjellen var ikke signifikant (p=0,06). Ved siste uttak i ferskvann var det ingen forskjeller i MDA konsentrasjon i lever (Figur 6.5). GSH konsentrasjonen var lavere i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> ved mellomuttaket (p=0,0001) og noe mindre forskjell ved sluttuttaket (p=0.049, Tukey post-hoc p=0,06) (Figur 6.6). Det var ingen forskjell i ratio mellom GSH og GSSG.



Figur 6.5. Konsentrasjon av malondialdehyd (MDA) i lever fra mellomuttaket (37-38 dager eksponering) og sluttuttaket i ferskvann (72-73 dagers eksponering) i forsøk 2.



Figur 6.6. Konsentrasjon av glutation (GSH) i lever fra mellomuttaket (37-38 dager eksponering) og sluttuttaket i ferskvann (72-73 dagers eksponering) i forsøk 2. Signifikante forskjeller er vist med ulike bokstaver (a, b).

## Velferd

I forsøk 1 ble det i den generelle velferdsevalueringen også undersøkt om økt CO<sub>2</sub> kunne påvirke utvikling av andre produksjonslidelser som katarakt og beindeformiteter, som en del av kartleggingen av effekter CO<sub>2</sub>-eksponering har på fisken. Dette ble også undersøkt ved avslutning av sjøvannsprøvet for å undersøke eventuelle langtidsvirkninger på velferd av CO<sub>2</sub>-eksponering i ferskvann. Det ble derimot ikke funnet en effekt av CO<sub>2</sub>-eksponering på forekomst eller alvorlighet av katarakt ved noen av uttakene i forsøk 1 og dette ble ikke videre undersøkt i forsøk 2.

I forsøk 1 ble det gjort røntgenundersøkelser av fisken i løpet av forsøket, og bilder ble tatt ved oppstart, før overføring til sjøvann og ved avslutning av forsøket i sjø, også med hensikt å kunne vurdere mulige utfellinger i nyre med røntgen. Det ble derimot ikke funnet makroskopiske synlige utfellinger i dette forsøket, og det var lav forekomst av beindeformiteter og ingen forskjeller i utvikling av beindeformiteter mellom gruppene.

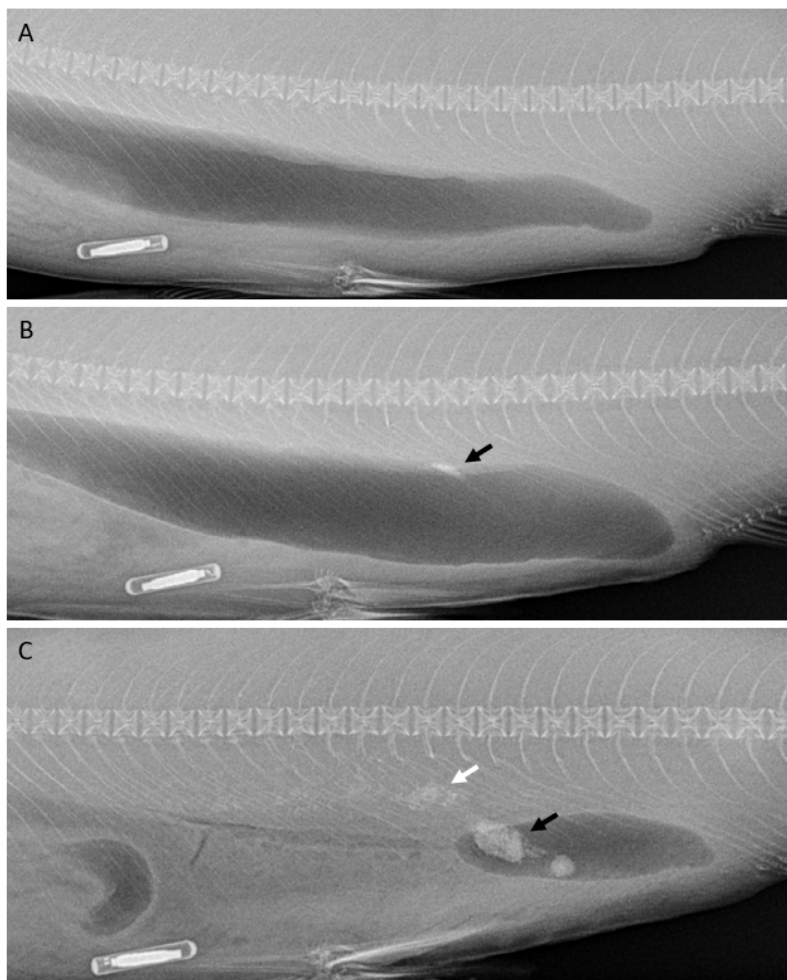
Mekaniske egenskaper i ryggvirvler ble undersøkt ved slutten av eksponeringsperioden i forsøk 2 (Tabell 6.2). Det var ingen forskjeller i ryggvirvlens lengde ( $p=0,41$ ), sviktegrense ( $p=0,35$ ), bruddpunkt ( $p=0,11$ ) og seighet ( $p=0,25$ ). Ryggvirvlene hadde derimot høyere elastisitetsmodul hos fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> sammenlignet med kontrollfisk (p=0,008). Det var ingen sammenheng mellom grad av nefrokalsinose og mekaniske egenskaper.

Tabell 6.2. Lengde (mm) og ulike mekaniske egenskaper i ryggvirvel ved avslutning av eksponeringsperioden i ferskvann i forsøk 2 (Snitt±SE). Signifikante forskjeller mellom behandlingene er vist med små bokstaver (a,b).

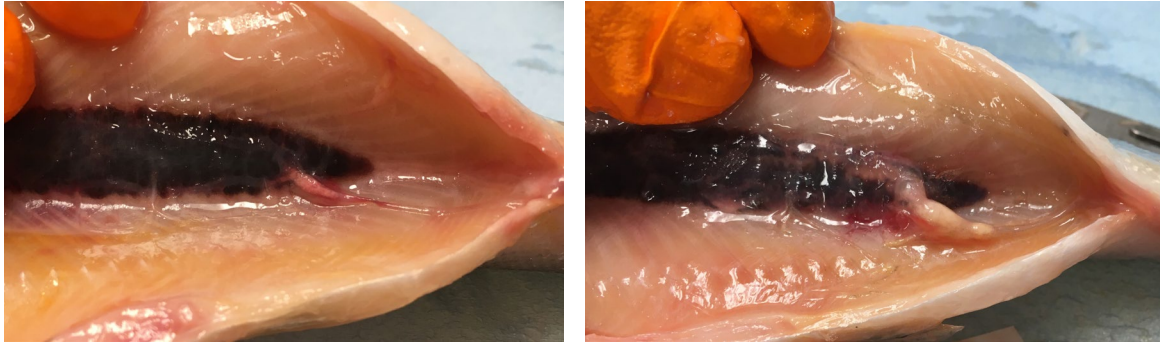
	Kontroll	CO2	CO2+O2
Virvel lengde	3.03 ± 0.07	2.95 ± 0.02	2.96 ± 0.05
Elastisitetsmodul	0.53 ± 0.02 b	0.61 ± 0.02 a	0.62 ± 0.02 a
Sviktgrense	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.3	4.0 ± 0.1
Bruddpunkt	6.9 ± 0.3	6.7 ± 0.2	7.3 ± 0.2
Seighet	78 ± 5	69 ± 5	78 ± 3

### Testing av røntgenmetode for å beskrive utfellinger i fisk

Fisk (n=69) fra en oppdrettspopulasjon med kjent NK problematikk ble først røntgen fotografert og så obduisert for å kartlegge om radiologi er en egnet metode for å diagnostisere NK hos laksesmolt. I 23 av fiskene ble det sett radiologiske forandringer som ble tolket som NK (Figur 6.7). 25 individer ble diagnostisert med NK ved obduksjon (Figur 6.8). 21 individer med mulige radiologiske endringer hadde NK ved disseksjon. 2 individer med mulige radiologiske endringer hadde ikke NK ved obduksjon; ett av disse hadde luftbobler i urinleder som kan ha gitt feildiagnose. Fire fisk hadde NK ved obduksjon uten registrerte radiologiske forandringer. Disse hadde små/milde forandringer.



Figur 6.7. Røntgen av rundfisk før obduksjon. (A) Normal fisk (152 g) uten forandringer. (B) Individ (188 g) med påvist forkalkning i urinleder ved obduksjon. Sort pil indikerer utfellingen i urinleder ved røntgen. (C) Individ (154 g) med påvist forkalkning i nyre og urinleder ved obduksjon. Hvit pil indikerer utfelling i nyre og sort pil utfelling i urinleder ved røntgen.



Figur 6.8. Bilder av fisk B (venstre) og C (høyre) ved obduksjon. Se Figur 6.7 for mer info.

## 6.4 DISKUSJON

### Mineralomsetning og utvikling av NK

I forsøk 1 ble mineralsammensetning i nyre undersøkt ved siste uttak i ferskvann (42 dagers eksponering) (Kapittel 3). Ingen forskjeller ble sett i konsentrasjonen av kalsium og fosfor i nyre for de ulike fiskegruppene eksponert for forhøyet CO<sub>2</sub> sammenlignet med kontroll, og det ble bare funnet mikroskopisk NK i 2/128 individ. Dette kan tyde på at CO<sub>2</sub> eksponeringen i dette forsøket ikke var høy nok til å påvirke fiskens mineralhomeostase. Disse resultatene står derimot i kontrast med tidligere funn, der samme CO<sub>2</sub> konsentrasjon (16 mg/L) førte til økt alvorlighet av NK i laksesmolt i ferskvann, samt forandringer i kalsiuminnhold i nyre (Fivelstad et al., 2003). I det tidligere forsøket av Fivelstad et al. (2003) ble smolt på samme størrelse som de minste fiskene i forsøk 1 (~70 gram) eksponert for forhøyet CO<sub>2</sub> i 57 dager, ved samme temperatur (7-9°C). Derimot er det forskjeller i smoltifiseringsregime og vannkvalitet, der fisken i Fivelstad et al. (2003) gikk på simulert naturlig fotoperiode (SNP) i ferskvann bufret med bikarbonat, i motsetning til lysstyring for årtidsuavhengig smoltifisering og ferskvann bufret med sjøvann i forsøk 1 i dette prosjektet. Dette kan ha vært utslagsgivende for ulike resultater.

I forsøk 2 ble det sett en økning i innholdet av både kalsium og fosfor i nyre i løpet av eksponeringsperioden, med nesten dobbelt så høye konsentrasjoner av kalsium ved sluttuttaket sammenlignet med mellomuttaket i alle grupper. I mellomuttaket, etter 37-38 dager eksponering, var det signifikant høyere konsentrasjon av kalsium og Ca:P ratio i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> enn i kontrollfisken, mens ingen forskjeller var sett på fosfor. Ved siste uttak i ferskvann, etter 58-59 dagers eksponering, var det ingen forskjeller i kalsium, fosfor eller Ca:P ratio på gruppenivå, men derimot ble det sett en sammenheng mellom Ca:P ratio og alvorlighet av NK, der Ca:P var høyere i fisk med score 2 enn i fisk med score 1 og 0.

I forsøk 2 var det en tydelig effekt av forhøyet CO<sub>2</sub> på utvikling av NK og forandringer i mineral i nyre. Det er derimot vanskelig å konkludere i forhold til om det bare er høyere CO<sub>2</sub> konsentrasjon som er utslagsgivende for forskjellen i resultat i de to forsøkene. Fiskene hadde tilsynelatende samme fysiologiske respons til forhøyet CO<sub>2</sub>, med alkalose (høy pH) i kombinasjon med forhøyet pCO<sub>2</sub> og bikarbonat i blod over lang tid, uten at dette førte til utvikling av NK i forsøk 1. I både forsøk 1 og 2 ble fisken smoltifisert ved å først gi vintersignal, fulgt av 350 døgngrader på kontinuerlig lys med samtidig CO<sub>2</sub> eksponering. Eksponeringsperioden var dermed lenger i forsøk 2 der fisken gikk på 5°C, men NK problematikken etter eksponering til CO<sub>2</sub> økte raskt i første del av forsøket, slik at det er mindre sannsynlig at forskjellene kan tilskrives varighet alene. I forsøket gjennomført av Fivelstad et al. (2003) og i forsøk 2 ble det brukt bikarbonat som buffer, mens det i forsøk 1 ble bufret ved en innblanding av sjøvann til en salinitet på 5-7 ‰, slik at en hypotese kan være at bufring med bikarbonat øker risiko

mens en lav innblanding av sjøvann kan redusere risiko for utvikling av NK som følge av CO<sub>2</sub> eksponering under smoltifisering. Resultater fra feltovervåkning kan derimot tyde på at høy innblanding (over 15 ‰) i siste del av settefiskfasen kan gi mindre reversibel nefrokalsinose som vedvarer lenger etter sjøutsett (*Figur 2.7*). En annen forskjell mellom forsøkene var temperatur. I feltovervåkningen ble det funnet NK i alle anlegg, på temperaturer fra 4-14°C ved påvisning, og det var anleggene med høyest temperatur som fikk påvist NK tidligst i produksjonen. Fisk fra anlegg A som inngikk i forsøk 1 hadde foruten CO<sub>2</sub>-eksponeringen i forsøket noenlunde like miljøforhold som i anlegget, med unntak av at temperaturen ble lavere i anlegget i siste periode før sjøutsetting som også sammenfalt med økt påvisning av NK.

Samlet sett tyder dette på en sammenheng mellom forhøyet CO<sub>2</sub> og forandringer i kalsium, men det er fortsatt noe usikkerhet knyttet til hvilke tilleggsfaktorer som må være til stede for at utfellinger skal skje.

### Mulig markør?

Utvikling av NK starter trolig med en akkumulering av kalsium i nyre, som kan føre til utfellinger som kan detekteres mikroskopisk (histologi) og senere makroskopiske utfellinger som vil kunne være synlige ved åpning av fisk eller ved bruk av røntgen (Jamfør *Figur 2.7*). Med bakgrunn i den generelle økningen av både kalsium og fosfor i nyrene i løpet av forsøkene, samt den store variasjonen i konsentrasjon, vil det være vanskelig å bruke en økning i konsentrasjon av kalsium alene som markør for NK. Basert på resultatene fra forsøk 2 kan trolig ratio mellom Ca:P gi en indikasjon på både unormal akkumulering av kalsium, og trolig også tilstedeværelse av mikroskopiske utfellinger, før det vil være synlige utfellinger i ekskresjonssystemet. Disse funnene bør undersøkes videre, da det er noen forbehold knyttet til at CO<sub>2</sub> eksponering generelt førte til en økning i Ca:P ratio selv om ikke alle fiskene utviklet NK. En mulig forklaring er at det er ulik progresjon av lidelsen i de ulike individene.

### Oksidativt stress

Ingen forskjeller ble funnet i akkumulering av MDA i lever i fisk som følge av CO<sub>2</sub> eksponering i forsøk 2, det var derimot indikasjon på at nivåene var lavere i fisk eksponert for bare CO<sub>2</sub>, enn både kontrollfisk og fisk eksponert for CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>. Konsentrasjonen av GSH var lavere i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> sammenlignet med kontrollfisk, noe som kan tyde på oksidativt stress som følge av behandlingene, til tross for at det ikke var forskjeller i MDA. Tidligere studier har vist at både parr og smolt eksponert for økende CO<sub>2</sub> konsentrasjoner hadde økte nivå av oksidasjonsprodukt i lever ved CO<sub>2</sub> konsentrasjoner over henholdsvis 21 og 25 mg/L (Remø et al., in prep). Til sammenligning har det også blitt funnet at eksponering av CO<sub>2</sub> også gir oksidativt stress i kveite (*Hippoglossus hippoglossus*), der det ble funnet økte nivåer av protein karbonyl (mål på oksiderte protein) i lever, samt endringer i konsentrasjon av antioksidantenzymet katalase (Carney Almroth et al., 2019). Økte konsentrasjoner av MDA i lever har også blitt relatert til perioder med rask vekst (Hamre et al., 2020), og det er derfor mulig at den lavere konsentrasjonen i fisken bare eksponert for CO<sub>2</sub> kan henge sammen med at vekstraten var lavere for denne gruppen (Kapittel 4).

### Bufferkapasitet

Som mål på bufferkapasitet ble konsentrasjon av histidin og NAH bestemt i hjerte, og anserin og karnosin i muskel. Både histidin og NAH har bufferegenskaper, og NAH er også en viktig osmolytt i hjertet, slik at disse påvirker både pH-regulering og vannbalanse. Fôringsforsøk med ulike nivåer av histidin har vist at det ved marginal histidintilførsel i fôret er vanskelig å påvirke konsentrasjonen av NAH i hjerte, som ser ut til å holdes noenlunde stabilt (Remø et al., 2014). Derimot har tidligere CO<sub>2</sub>-eksponeringsforsøk vist at bufferkapasiteten øker i hjerte hos fisk eksponert for økende

konsentrasjoner av CO<sub>2</sub> (Remø et al., in prep). I forsøk 1 ble det ikke funnet forskjeller mellom gruppene i hverken histidin eller NAH konsentrasjon i hjerte, noe som kan tyde på at konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> ikke var høy nok til å påvirke denne responsen. I forsøk 2 ble det derimot sett en økning i histidin i fisk eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> ved mellomuttaket, mens det ved sluttuttaket ikke var signifikante forskjeller. NAH konsentrasjonen i hjerte var også høyere i fisk eksponert for bare CO<sub>2</sub> sammenlignet med kontrollfisk, men ikke CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> ved sluttuttaket, noe som kan ha betydning for bufferkapasiteten til hjertet. Som beskrevet i tidligere kapitler innebærer CO<sub>2</sub> eksponering først en forsuring av blodet, som i løpet av en uke blir normalisert gjennom bufring med bikarbonat. I dette prosjektet ble fisken undersøkt etter henholdsvis 42 dager i forsøk 1 og 37-38 og 72-73 dager i forsøk 2, på tidspunkt der pH i blodet var stabilt og høyt (Kapittel 3 og 4). Til tross for at pCO<sub>2</sub> var høyt i de eksponerte gruppene (over 15 mm Hg) var det i tillegg forhøyet bikarbonat i plasma (rundt dobbelt så høyt i CO<sub>2</sub> eksponert fisk som i kontrollfisk).

Histidin blir i muskel brukt i syntesen av karnosin og anserin, der laks har spesielt høye konsentrasjoner av anserin, som er regnet som en viktig buffersubstans i muskel. Konsentrasjonen av disse var ikke påvirket av CO<sub>2</sub> eksponering ved noen av uttakene, men en økning i histidin ble sett ved begge tidspunkt.

Dette kan bety at bufferkapasiteten til muskelen ikke ble påvirket av behandlingene, eller at det var stabilisert slik som i hjerte. Prøveuttakene ble som beskrevet over gjort etter lang tids eksponering, på et tidspunkt der plasma pH var stabilt og plasma bikarbonat hadde vært forhøyet over en lang periode, slik at tidlige effekter ved forsuring av blod og metabolsk acidose ikke kan utelukkes.

Det ble derimot funnet forandringer i konsentrasjonen av flere andre aminosyrer i muskel både ved mellomuttaket og siste uttak i ferskvann. Endrede konsentrasjoner av aminosyrer kan trolig sees i sammenheng med redusert muskelvekst, relatert til redusert anabolisme eller økt katabolisme. Spesielt i forsøk 2 var veksten til fisken lavere ved CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> eksponering, men på grunn av den lave temperaturen i forsøket var også veksten i kontrollgruppen svært lav (kapittel 4). Lignende resultater har blitt funnet i tidligere studier som har vist forandringer i konsentrasjonen av frie aminosyrer i muskel som tyder på forandringer i energimetabolisme ved hyperkapnia (Waagbø et al., 2008).

### Sammenheng mellom NK, CO<sub>2</sub> eksponering og andre produksjonslidelser?

I forsøk 1 ble kataraktutvikling undersøkt like før sjøvannsoverføring og etter perioden med oppfølging i sjø for å undersøke mulige langtidsvirkninger av CO<sub>2</sub> eksponering i ferskvann, men ingen forskjeller ble funnet. Katarakt har også blitt undersøkt i tidligere CO<sub>2</sub> eksponeringsforsøk med parr i ferskvann, der fisken ble eksponert for 18 mg/L CO<sub>2</sub>, med svært lave innslag av katarakt (Waagbø et al., 2008). Det ble heller ikke sett forskjeller i katarakt hos post-smolt eksponert for 5-40 mg/L CO<sub>2</sub> i RAS (Mota et al., 2019), noe som kan tyde på at CO<sub>2</sub> eksponering ikke medfører økt risiko for kataraktutvikling hos laks. Til sammenligning har studier på torskeyngel (*Gadus morhua* L.) eksponert for 18 mg/L CO<sub>2</sub> vist økt prevalens og alvorlighet av katarakt (Moran et al., 2012). Katarakt er på lik linje med NK en multifaktoriell produksjonsrelatert lidelse, og er i tillegg til ernæringsmangler assosiert med ulike miljøforhold som fører til oksidativt stress og problem med osmoregulering hos laks, og det kan derfor ikke utelukkes effekter ved langvarig eksponering i kombinasjon med andre miljøforhold med bakgrunn i de systemiske forandringene knyttet til histidinmetabolisme og oksidativt stress.

I forsøk 2 ble også mekaniske egenskaper undersøkt i ryggvirvler fra samme fisk som ble brukt til bestemmelse av mineralinnhold i nyre og histologi. Ved slutten av eksponeringsperioden i ferskvann hadde fiskene eksponert for CO<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>+O<sub>2</sub> høyere elastisitetsmodul, noe som kan tyde på økt beinmineralisering. Det var derimot ingen korrelasjon mellom grad av NK og mekaniske egenskaper i



ryggvirvler på individnivå. Forandringer i beinmineralisering ved økt CO<sub>2</sub> har også blitt vist ved flere tidligere studier, med noe varierende resultater fra ulike forsøk. For eksempel hadde Hvit havabbor (*Epinephelus aeneus*) eksponert for CO<sub>2</sub> forhøyet kalsium i bein, mens ingen forskjeller ble sett på konsentrasjonen av fosfor (Elsadin et al., 2019). I motsetning viste et studie av Gil Martens et al. (2006) forhøyet askeinnhold i bein fra laks eksponert for CO<sub>2</sub>, med forhøyet konsentrasjon av fosfor, men ingen forskjeller i kalsium og Ca:P ratio. Flere studier har også vist interaksjoner mellom fosfornivå i fôret og forhøyet CO<sub>2</sub> i vannet, med forbedret mineralisering av bein ved lave fosfornivå kombinert med høy CO<sub>2</sub> (Drabikova et al., 2023, Helland et al., 2005), slik at forskjeller i utfall i de ovennevnte studiene også kan ha sammenheng med forskjeller i mineralinnhold i fôret.

## 7 LEVERANSER I PROSJEKTET

---

### Rapport

Nilsen, A., Fivelstad, S., Hosfeld, C.D., Olsen, A.B., Lie, K.I., Kraugerud, M., Fjellidal, P.G., Mayer, I., Sommerset, I. Remø, S.C. (2024). *STONEHUNT: Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom: Årsakssammenhenger og muligheter for forebygging. Sluttrapport FHF-901588.*

### Medieomtale

30.04.2020 Prosjektpresentasjon i Norsk Fiskeoppdrett. Kvittert NFO No4 April 2020 (s 42-45)

### Populærvitenskapelige artikler

Nilsen, A., Fivelstad, S., Hosfeld, C.D., M., Olsen, A.B., Lie, K.I., Kraugerud, Fjellidal, P.G., Mayer, I., Sommerset, I. Remø, S.C. (2024). Nefrokalsinose og HSS, erfaringer fra forsøk og kartlegging i felt. NFO april 2024 (under skriving).

### Presentasjoner

Sveinung Fivelstad et al. (2022). Frisk Fisk, Bergen 30.05.2022, Innlegg: Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom (HSS) hos laksesmolt,

Olsen, A.B., Fivelstad, S., Sture, M.G., Sandnes, K, Kvalvik, H., Jensen, T.T., Hosfeld, C.D., Sommerset, I., Nilsen, A., (2022). Frisk Fisk, Bergen 30.05.2022, Poster: Nefrokalsinose hos laksesmolt under eksperimentelle forhold – en patologisk studie.

Olsen, A.B., Fivelstad, S., Sture, M.G., Sandnes, K, Kvalvik, H., Jensen, T.T., Hosfeld, C.D., Sommerset, I., Nilsen, A., (2022). Fagseminar om Nefrokalsinose (webinar) 23.06.2022, Aqua Kompetanse AS: STONEHUNT, HSS og nefrokalsinose hos laksesmolt.

Nilsen, A., Sommerset, I., Olsen, A.B., Fivelstad, S., Hosfeld, C.D., Remø, S., Kraugerud, M., Lie, K.I., Mayer, I., (2023). Stonehunt oppdatering.

EWOS Mikroteket, Bodø, 16.11.2023, Bergen 23.11.2023, Trondheim 26.01,24, Tromsø 01.02.24

### Vitenskapelige artikler under arbeid

Fivelstad, S., et al. (2024). Nephrocalcinosis during parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to hypercapnia and to a combination of hypercapnia and hyperoxia (under skriving)

Olsen, A.B., et al. (2024). Haemorrhagic smolt syndrome (HSS): Description of the pathology and physiology from an outbreak of HSS in a controlled trial with Atlantic salmon presmolt exposed to a combination of hypercapnia and hyperoxia (under skriving).

### Andre publikasjoner

Michelsen, E.J.B., 2021. Nefrokalsinose: Utvikling av sykdom under høyt og lavt CO<sub>2</sub> nivå med fokus på histopatologiske forandringer og mineralnivå i nyren. Master thesis, Universitetet i Bergen, det matematisk-vitenskapelige fakultet. <https://hdl.handle.net/11250/2831791>

## 8 REFERANSER

---

- Abe, H. (2000). Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Moscow)*. Translated from *Biokhimiya*, Vol. 65, No. 7, 2000, pp. 891-900.
- Akvakulturdriftsforskriften (2004), Forskrift om drift av akvakulturanlegg. FOR-2004-12-22-1785 (Norsk), Available at: [<https://lovdata.no/forskrift/2004-12-22-1785>]
- Akvakulturdriftsforskriften (2008), Forskrift om drift av akvakulturanlegg. FOR-2008-06-17-822 (Norsk) Available at: [<https://lovdata.no/forskrift/2008-06-17-822>]
- Alne, H., Oehme, M., Thomassen, M., Terjesen, B. & Rørvik, K-A. (2011), Reduced growth, condition factor and body energy levels in Atlantic salmon *Salmo salar* L. during their first spring in the sea. *Aquaculture Research*, Vol. 42, pp. 248-259.
- Anderson, B. G., & Loew en, R. D. (1975). Renal morphology of freshwater trout. *American Journal of Anatomy*, Vol. 143(1), pp. 93-113.
- Anon, (2004). Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften). Fastsatt av fiskeri-og kystdepartementet 22. Desember 2004 med hjemmel i lov 14. Juni 1985 nr. 68 om oppdrett av fisk, skalldyr (Norsk) (Står som (FOA, 2004) i teksten, må rettes opp.)
- Barton, B. A. (2002), Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integ. and comp. Biol.*, Vol. 42, pp. 517–525.
- Boutilier, R.G., Heming, T.A., Iwama & G.K. (1984), Physiochemical parameters for use in fish respiratory physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology XA*. Academic Press, New York, pp. 401–430.
- Brauner, C.J., Seidelin, M., Madsen, S.S. & Jensen, F.B. (2000). Effects of freshwater hyperoxia and hypercapnia and their influences on subsequent seawater transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts, *The Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 57, pp. 2054–2064.
- Brauner, C. J., Shartau, R. B., Damsgaard, C., Esbaugh, A. J., Wilson, R. W. & Grosell, M. (2019). Acid-base physiology and CO<sub>2</sub> homeostasis: Regulation and compensation in response to elevated environmental CO<sub>2</sub>. In: Grosell, M., Munday, P.L., Farrell, A.P., Brauner C.J. (Eds.), *Carbon Dioxide*, Academic Press, pp. 69-153
- Brown, M.B. and Forsythe, A.B. (1974) Robust Tests for Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 69, pp. 364-367.
- Calabrese, S., Imsland, A. K. D., Nilsen, T. O., Kolarevic, J., Ebbesson, L. O. E., Hosfeld, C. D., Fivelstad, S., Pedrosa, C., Terjesen, B. F., Stefansson, S. O., Takle, H., Sveier, H., Mathisen, F., Handeland, S. O., (2023). Water Flow Requirements of Post-smolt Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Reared in Intensive Seawater Flow-through Systems: A Physiological Perspective. *Fishes*, 8, 285.
- Calabrese, S. (2017). Environmental and biological requirements of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in closed-containment aquaculture systems. Doctoral thesis. The University of Bergen.
- Cameron, J. N., and Iwama, G. K. (1987), Compensation of progressive hypercapnia in channel catfish and blue crabs, *Journal of Experimental Biology*, Vol. 133, pp. 183 –197
- Carney Almroth, B., Bresolin De Souza, K., Jönsson, E. & Sturve, J. (2019), Oxidative stress and biomarker responses in the Atlantic halibut after long term exposure to elevated CO<sub>2</sub> and a range of temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 238, 110321.

- Dalum, S., A; Poppe, T, T, Lunheim, A, S, Reed, K, A; Holm, H. & Johansen, R. (2019). Nefrokalsinose - ukjent årsak til økt forekomst av nyreproblemer hos norsk oppdrettslaks. *Norsk fiskeoppdrett* 3, 68-72.
- Dickson, F.J. & Sayer, J. A. (2020), Nephrocalcinosis: A Review of Monogenic Causes and Insights They Provide into This Heterogeneous Condition. *International Journal of Molecular Sciences*. Jan 6; 21(1):369.
- Drábiková, L., Fjellidal, P.G., Yousaf, M.N., Morken, T., De Clercq, A., McGurk C. & Witten, P.E. (2023), Elevated Water CO<sub>2</sub> Can Prevent Dietary-Induced Osteomalacia in Post-Smolt Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). *Biomolecules* 2023, 13, 663.
- Eddy, F.B., Lomholt, J.B., Weber, J.P., Weber, R.E. & Johanson, K., (1977). Blood respiratory properties of rainbow trout kept in water of high CO<sub>2</sub> tension. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 67, pp. 37–47.
- Eddy, F.B., Smart, G.R., Bath, R.N. (1979), Ionic content of muscle and urine in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson kept in water of high CO<sub>2</sub> content. *Journal of Fish Diseases*, Vol. 2 (1979), pp. 105-110
- Elsadin, S., Nixon, O., Mozes, N., Allon, G., Gaon, A., Tandler, A. & Koven, W. (2019), The effect of dissolved carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) on the bone mineral content and on the expression of bone-Gla protein (BGP, Osteocalcin) in the vertebral column of white grouper (*Epinephelus aeneus*). *Aquaculture*, 511, 634196.
- Esbaugh, A. J., Heuer, R., and Grosell, M., (2012) Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid–base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *Journal of Comparative Physiology B* Vol. 182(7), pp. 921–934.
- Esbaugh, A. J., Perry, S. F., Bayaa, M., Georgalis, T., Nickerson, J., Tufts, B. L. & Gilmour, K. M. (2005), Cytoplasmic carbonic anhydrase isozymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: comparative physiology and molecular evolution. *The Journal of Experimental Biology* Vol. 208, pp. 1951-1961
- Evans, D. H, Piermarini, PM, & Choe, KP (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85 (1), 97-177.
- Everitt, B. S. (2002), *The Cambridge Dictionary of Statistics* (Second edition), CUP (2002), pp. 1-410
- Fivelstad, S. (2013), Long-term carbon dioxide experiments with salmonids. *Aquacultural Engineering*, Vol. 53, pp. 40-48.
- Fivelstad, S., Bergheim, A., Waagbø, R., Olsen, A. B. and Colt, J. (2020) Excess Dissolved Gases including Gas Bubble Disease. In: *Climate Change and Non-infectious Fish Disorders* (Edited by P. T. K. Woo and G. K. Iwama, ISBN: 9781786393982).
- Fivelstad, S., Binde, M. (1994), Effects of reduced water flow in soft water on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) while maintaining oxygen at constant level by oxygenation of the inlet water. *Aquacultural engineering*, Vol. 13, pp. 211–238.
- Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G. & Olsen, A.B. (1998), Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon post smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. *Aquaculture*, Vol. 160, pp. 305–316.
- Fivelstad, S., Hosfeld, C. D., Medhus, R. A., Olsen, A. B. & Kvamme, K. (2018), Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures. *Aquaculture*, 482, 83-89.
- Fivelstad, S., Kvamme, K., Handeland, S., Fivelstad, M., and Olsen, A.B. 2015. Growth and physiological models for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr exposed to elevated carbon dioxide concentrations at high temperature. *Aquaculture* 436, 90-94.

- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Kløften, H., Ski, H. & Stefansson, S. (1999), Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*, Vol. 178, pp. 171–177.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Stefansson, S., Handeland, S., Waagbø, R., Kroglund, F. & Colt, J. (2004), Lack of long-term sublethal effects of reduced freshwater pH alone on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts subsequently transferred to seawater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 61, pp. 511–518.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Waagbø, R., Zeitz, S., Hosfeld, A.C.D., Stefansson, S. (2003a), A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) physiology and growth. *Aquaculture*, 215, 339–357.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Åsgård, T., Bæverfjord, G., Rasmussen, T., Vindheim, T., Stefansson, S. (2003b), Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalsinosis and growth parameters. *Aquaculture*, 215, 301–319.
- Gil Martens, L., Witten, P. E., Fivelstad, S., Huysseune, A., Sævareid, B., Vikeså, V. & Obach, A. (2006), Impact of high water carbon dioxide levels on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): Effects on fish performance, vertebrae composition and structure. *Aquaculture*, 261, 80-88.
- Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1647-1661. doi:10.1242/jeb.029181.
- Gjessing, M. (2020). Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom - årsakssammenhenger og muligheter for forebygging. *Norsk Veterinær Tidsskrift*, 5-2020.
- Good, C., Davidson, J., Terjesen, B. F., Takle, H. R., Kolarevic, J., Bæverfjord, G., & Summerfelt, S. T. (2018). The effects of long-term 20 mg/L carbon dioxide exposure on the health and performance of Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolts in water recirculation aquaculture systems, *Aquacultural Engineering*, Vol 81, pp. 1-9.
- Graff, I. E., Waagbø, R., Fivelstad, S., Vermeer, C., Lie, Ø. & Lundebye, A. K. (2002), A multivariate study on the effects of dietary vitamin K, vitamin D3 and calcium, and dissolved carbon dioxide on growth, bone minerals, vitamin status and health performance in smolting Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 25 pp. 599 – 614.
- Gray N. F. (2010), *Water Technology – An introduction for Environmental Scientists and Engineers*. 3. Edition. London, Elsevier. pp. 50-53.
- Grefsrud, S., Ellen; Karlsen, Ørjan; Kvamme, O, Bjørn; Glover, Kevin; Husa, Vivian; Hansen K, Pia; Grøsvik, E, Bjørn; Samuelsen, Ole; Sandlud Nina; Stien, H, Lars; Svåsand, Terje. (2021). Risikorapport Norsk fiskeoppdrett 2021- Risikovurdering, rapport fra Havforskningen 2021 – nr. 8
- Grosell, M. (2019), CO2 and calcification process in fish. In: Grosell, M., Munday, P.L., Farrell, A.P., Brauner C.J. (Eds.), *Carbon Dioxide*, Academic Press, pp. 287-321
- Hamre, K., Micallef, G., Hillestad, M., Johansen, J., Remø, S., Zhang, W., Ødegård, E., Araujo, P., Prabhu Philip, A. J. & Waagbø, R. (2022), Changes in daylength and temperature from April until August for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea cages, increase growth, and may cause consumption of antioxidants, onset of cataracts and increased oxidation of fillet astaxanthin, *Aquaculture* 2022, Vol. 551, 737950
- Handeland, S.O. & Stefansson, S.O., (2001), Photoperiod control and influence of body size on off-season parr-smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture* 192, 291–307.

- Heisler, N., 1984. Acid-base regulation in fishes. In: Hoar, W.S. and Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology XA*, Academic Press, New York, pp. 315-399.
- Heisler, N., (1986), Mechanisms and limitations of fish acid-base regulation. In: S. Nilsson and S. Holmgren (Editors), *Fish physiology: recent advances*, Croom Helm, London, pp. 24-49.
- Helland, S., Refstie, S., Espmark, Å., Hjelde, K. & Baeverfjord, G. (2005), Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. *Aquaculture*, Vol. 250, pp. 364-376.
- Heuer, R. M. & Grosell, M. (2014), Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 307, R1061-R1084.
- Hosfeld, C.D., Engevik, A., Mollan, T., Lunde, T., Waagbø, R., Olsen, A. B., Breck, O., Stefansson, S. & Fivelstad, S., (2008) Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 280 (1-4), 146-153.
- Jansen R. G. & Randall, D. J. (1975), The effects of change in pH and PCO<sub>2</sub> in blood and water on breathing rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Respiration Physiology* Vol. 25, pp. 235-245.
- Julshamn, K., Brenna, J., Holland, R. & Tanner, S. (1999), Plasma source mass spectroscopy – new developments and applications. *Royal Society of Chemistry*, 241, 167-172.
- Julshamn, K., Maage, A., & Norli, H. S. (2007), Determination of arsenic, cadmium, mercury and lead by inductively coupled plasma/mass spectrometry in foods after pressure digestion. NMKL interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 90, 846–858.
- Kieffer, J. D., Currie, S., and Tufts, B. I. (1994), Effects of environmental temperature on the metabolic and acid–base responses of rainbow trout to exhaustive exercise. (1994), *Journal of Experimental Biology*, Vol. 194, pp. 299–317
- Klykken, C, Reed, A. K., Dalum, A. S., Olsen, R. E., Moe, M. K., Attramadal, K. J. K. & Boissonnot, L., (2022), Physiological changes observed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with nephrocalcinosis, *Aquaculture*, 554, 738104.
- Klykken, C., Khan, E., Karlsten, C., Reed, A. K., Attramadal, K. J. K. Olsen, R. E & Boissonnot, L., (2023), Nephrocalcinosis in juvenile farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) may be linked to osmoregulatory stress. *J.Fish.Dis*, Vol 46 (9), pp. 943-956.
- Kristensen, T., Åtland, A., Rosten, T, Urke, H. A. & Rosseland, B. O. (2009), Important influent-water quality parameters at freshwater production sites in two salmon producing countries. *Aquacultural Engineering*, Vol. 41, pp. 53–59
- Kroglund, F. & Finstad, B. (2003), Low concentrations of inorganic monomeric aluminium impair physiological status and marine survival of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 222, 119–133.
- Martens, L. G., Witten, P. E., Fivelstad, S., Huysseune, A., Sævareid, B., Vikeså, V. & Obach, A. (2006), Impact of high water carbon dioxide levels on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): Effects on fish performance, vertebrae composition and structure, *Aquaculture*, 261, 80-88.
- McArley, T. J., Sandblom, E., and Herbert, N. A. (2021), Fish and hyperoxia— from cardiorespiratory and biochemical adjustments to aquaculture and ecophysiology implications (2021). *Fish and fisheries*. Vol 22(2), 324-355
- Minarova, H., Palikova, M., Kopp, O. M, Mares, J., Mikulikova, I., Papezikova, I., Piacek, V., Pojezdal, L. & Pikula, J. (2023). Nephrocalcinosis in farmed salmonids: diagnostic challenges associated with low performance and sporadic mortality. *Frontiers in Veterinary Science* 10, 1121296

- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. & Moon, T. W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- Moran, D., Tubbs, L. & Støttrup, J. G. (2012), Chronic CO<sub>2</sub> exposure markedly increases the incidence of cataracts in juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture*, 364-365, 212-216.
- Mota, V. C., Nilsen, T. O., Gerwins, J., Gallo, M., Kolarevic, J., Krasnov, A. & Terjesen, B. F. (2020). Molecular and physiological responses to long-term carbon dioxide exposure in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 519, 734715.
- Mota, V. C., Nilsen, T. O., Gerwins, J., Gallo, M., Ytteborg, E., Baeverfjord, G., Kolarevic, J., Summerfelt, S. T. & Terjesen, B. F. (2019), The effects of carbon dioxide on growth performance, welfare, and health of Atlantic salmon post-smolt (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems, *Aquaculture*, 498, 578-586.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L. H., Iversen, M. H., Kolarevic, J. & Gismervik, K. (2018). Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. 312 pp, Nofima, 2018.
- Ogata, H.Y., Konno, S. and Silverstein, J.T. (1998), Muscular buffering capacity of the parr and smolts in *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture*, 168, 303-310.
- Ogata, H.Y. & Murai, T. (1994), White muscle of masu salmon, *Oncorhynchus masou masou*, smolts possesses a strong buffering capacity due to a high level of anserine. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13, 285-293.
- Pelster, B. & Decker, H. (2004), The Root effect—a physiological perspective. *Micron*, Vol. 35, Issues 1–2. XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, pp. 73–74.
- Perry, S. F., & Gilmour, K. M. (2006). Acid-base balance and CO<sub>2</sub> excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respir Physiol Neurobiol*, 154(1-2), 199-215.
- Person-Le Ruyet, J., Pichavant, K., Vacher, C., Le Bayon, N., Sévère, A. & Boeuf, G. (2002), Effects of O<sub>2</sub> supersaturation on metabolism and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 205, 373–383.
- Pickering, A. D. (1993), Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111, 51-63.
- Pörtner, H. O., Langenbuch, M. & Reipschläger, A. (2004), Biological Impact of Elevated Ocean CO<sub>2</sub> Concentrations: Lessons from Animal Physiology and Earth History. *Journal of Oceanography*, 60, 705718.
- Remø, S. C., Fivelstad, S. & Waagbø, R. (in prep). Metabolic adaptations in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and smolt exposed to increasing water CO<sub>2</sub> concentrations.
- Remø, S.C., Hevrøy, E.M., Olsvik, P.A., Fontanillas, R., Breck, O., & Waagbø, R. 2014. Dietary histidine requirement to reduce the risk and severity of cataracts is higher than the requirement for growth in Atlantic salmon smolts, independently of the dietary lipid source. *British Journal of Nutrition*.111(10):1759-72.
- Rodger H. D. and Richards R. H. (1998). Haemorrhagic smolt syndrome: a severe anaemic condition in farmed salmon in Scotland. *Veterinary Record*, 142:538-541.
- Rosten, T. (2009) Oksygen i vann - hva er det beste for fisken? *Vann*, 04/2009, 367-374.
- Sandnes, K., O. Lie, and R. Waagbo. (1988), "Normal Ranges of Some Blood Chemistry Parameters in Adult Farmed Atlantic Salmon, *Salmo Salar*." *Journal of Fish Biology* 32.1 (1988): 129–136.
- Sayer, J. A., Carr, G. & Simmons, N. L. (2004), Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clinical Science*, 106, 549-561.
- Shavit, L., Jaeger, P. & Unwin, R. J. (2015), What is nephrocalcinosis? *Kidney International*, 88, 35-43.

- Skov, P. V., (2019), CO<sub>2</sub> in aquaculture. In: Grosell, M., Munday, P.L., Farrell, A.P., Brauner C.J. (Eds.), Carbon Dioxide, Academic Press, pp. 287-321
- Smart, G.R. (1981), Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: Pickering, A.D. (Ed.), Stress and Fish. Academic Press, London, pp. 277–289.
- Small, B.C. Chapter 8 – Nutritional physiology. In: Hardy, R. & Kaushik, S. (eds.) Fish Nutrition, 4th Edition Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-819587-1
- Smart, G.R., Knox, D., Harrison, J.G., Ralph, J.A., Richards, R.H. & Cowey, C.B., (1979). Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentration. Journal of Fish Diseases, Vol. 2, pp. 279–289.
- Sommerset, I., Walde, C. S., Bang Jensen, B., Bornø, B., Haukaas, A. & Brun, E. (Eds.) (2020), Fiskehelse rapporten 2019. 5a/2020. published by the Norwegian Veterinary Institute, 2020.
- Sommerset I., Bang Jensen B., Bornø B., Haukaas A. & Brun E. (Eds.) (2021), Fiskehelse rapporten 2020, published by the Norwegian Veterinary Institute, 2021
- Sommerset I., Walde C. S., Bang Jensen B., Wiik-Nielsen J., Bornø G., Oliveira V. H. S., Haukaas A. & Brun E. (Eds.) (2022), Fiskehelse rapporten 2021, Veterinærinstituttets rapportserie nr. 2a/2022 published by the Norwegian Veterinary Institute, 2022
- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Oliveira, V. H. S., Moldal, T., Bornø, G., Haukaas, A. & Brun, E. (Eds.) (2023), Fiskehelse rapporten 2022. Veterinærinstituttets rapportserie nr. 5a/2023, published by the Norwegian Veterinary Institute, 2023.
- Stien, L. H., Bracke, M. B. M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P. J., Vindas, M. A., Øverli, Ø. & Kristiansen, T. S. (2013), Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. Reviews in Aquaculture (2013) 5, 33–57
- Summerfelt, S. T., Zühlke, A., Kolarevic, J., Megård Reiten, B. K., Selset, R., Gutierrez, X. & Fyhn Terjesen, B. (2015), Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors, Aquacultural Engineering, 65, 46-54.
- Thorarensen, H. & Farrell, A. (2011). The biological requirements for post-smolt Atlantic salmon in closed-containment systems. Aquaculture. 312, 1-14
- Waagbø, R., Hosfeld, C. D., Fivelstad, S., Olsvik, P. & Breck, O., (2008), The impact of different water gas levels on cataract formation, muscle and lens free amino acids, and lens antioxidant enzymes and heat shock protein mRNA abundance in smolting Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Comp. Biochem. Physiol. A., 149, 396-404.
- Wall T & Bjerkås E (1999) A simplified method of scoring cataracts in fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 19, 162–165.
- Wheatly, G. M., Hobe, H. & Wood, C. M., (1984), The mechanisms of acid-base and ionregulation in the freshwater rainbow trout during environmental hyperoxia and subsequent normoxia. II The role of the kidney. Respiration physiology, 55, 155 – 173.
- Wood, C.M., (1991), Branchial ion and acid–base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. Physiol. Zool. 64, 68–102.



## 9.1 Veiledning for uttak av prøver til FHF STONEHUNT



### Veiledning for uttak av prøver til FHF STONEHUNT

Det utføres tre prøveuttak på settefiskanlegget (parr, pre-smolt og smolt). Gruppen planlegges fulgt videre i sjøfasen fram til maksimum 6 måneder etter sjøsetting.

Prøveuttak i settefiskanlegg:

- Parr (ca. 20-40g)
- Pre-smolt (ca. 40-80g)
- Smolt (ca 80– 200g)

Det tas prøve fra 20 fisk fra karet (fiskegruppen) som skal følges. Disse 20 fordeles på svimere og normalfisk (minst 1/3), der tilstanden til hvert individ registreres i prøveskjema. For prosjektet ønskes primært svimere med mistanke om subklinisk HSS og/eller nefrokalsinose, ikke taperfisk. Vekt, lengde, parrmerker og sølvfarge/blankhet registreres også for hvert individ og prøvene tas i rekkefølgen beskrevet i denne veilederen.

#### Smoltgrad

Sølvfarge og parrmerker scores separat og noteres i prøveskjema:

<b>Sølvfarge/blankhet</b>	0: Ingen (lys rygg, grønne flanker, gul buk)	1: Svak (flankene begynner å bli sølvfargede, gul buk)	2: Synlig (flankene for det meste sølvfargede, men svak gul/grønnfarge vedvarer)	3: Sølvfarget (mørk rygg, sølvfargede flanker, hvit buk)
<b>Parrmerker</b>	0: Mangler	1: Svake	2: Synlige	3: Tydelige

1. Blodprøve
  - a. Hematokrit
  - b. Blodutstryk
  - c. Fullblod på heparin til plasma
2. Skjellprøve
3. Gjelle på RNAlater
4. Gjelle på SEI buffer
5. Organpakke på formalin
6. Ved funn av tydelige utfellinger i nyre: nyrestein

Vannprøve og evt. fôrprøve til prosjektet kan taes ut samme dag. Se egen prosedyre og forsendelse fra/til Høgskulen på Vestlandet.

## Blodprøve, plasma

Dersom prøvetaking med Monovette er vanskelig på liten fisk, går det også fint å bruke hepariniserte sprøyter. Vacutainere bør unngås da disse ofte gir hemolyse.

### Utstyr (medfølger prøvepakken):

- S-Monovette (1,2 ml til 1. prøveuttak (parr), 2, 4ml til 2. og 3 prøveuttak)
- S-Monovette kanyler korte til 1. prøveuttak, lange til 2. og 3. prøveuttak)
- Eppendorfrør til plasma
- Engangspipetter

### Metode:

1. Monovettebeholderen inneholder litium heparin og brukes i stedet for vacutainer for å unngå hemolyse. Kulene i Monovetten forhindrer at blodlegemer blandes med plasma etter sentrifugering (disse løses med andre ord ikke opp). Fest på kanylen på Monovette beholderen ved å vri kanylen 90°. Ta prøven fra halevenen, enten fra den caudale midtlinjen bak gattet eller fra siden (Figur 1). Tørk stikkstedet med papir før kanylen føres inn. Når kanylen treffer halevenen, dras stempelet ut slik at hele beholderen fylles. [Den fremste delen av Monovetten kan gjøre det vanskelig å se innkommende blod, så se nøye etter før kanylen evt. flyttes på.](#) Deretter trekkes kanylen ut og tas av Monovetten. Stempelet på Monovetten knekkes av. Vend Monovetten 4-5 ganger for å blande heparinet.
2. Det må tas ut blod til blodutstryk og hematokritt. Dette kan enten gjøres fra baksiden av den blodfylte kanylen eller ved å åpne Monovettens skrukork.
3. Monovetten oppbevares på is til sentrifugering i 10 minutter på 5000rpm i 10 minutter. Plasma pipetteres over i eppendorfrør. Disse oppbevares og sendes på is.



Figur 1: Metode for blodprøvetaking fra halevenen og S-Monovette og kanyler med Litium heparin.

## Hematokritt; ferskt blod

### Utstyr (medfølger prøvepakke, med mindre annet er avtalt):

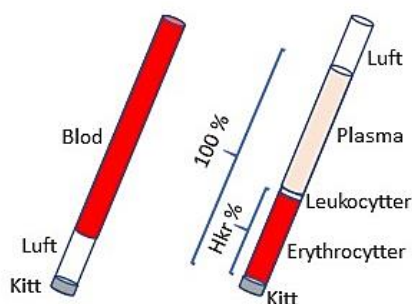
- Kapillærrør
- Voks (kitt) plate
- Kapillærsentrifuge
- Prøveskjema (kolonne til å notere Ht resultat)

- Måleskive (følger med sentrifugen) eller linjal

#### Prosedyre:

1. Fyll kapillærrør ca  $\frac{3}{4}$  fulle med blod (Figur 2).
2. Tett med kitt/voks i enden uten blod.
3. Plasser i sentrifuge med kittenden utover.
4. Ha på lokk og sentrifuger (5 min, 10 000 rpm)

Hematokritt er %-del av hele blodsøylen. Bruk måleskive eller linjal.



Figur 2. Fylling av kapillærrør

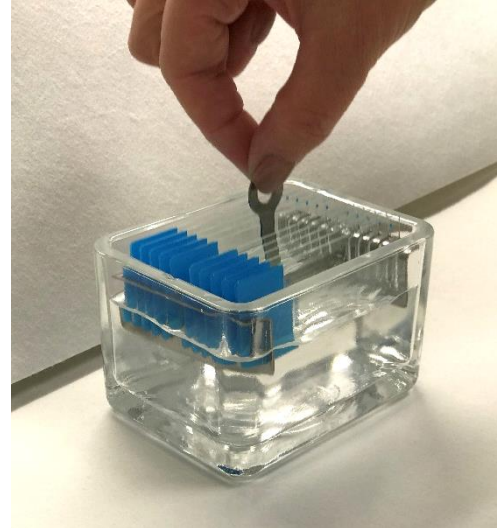
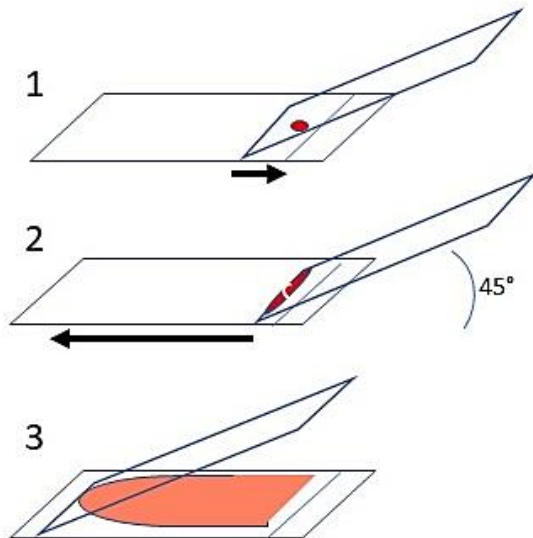
## Blodutstryk; ferskt blod

#### Utstyr (medfølger prøvepakke):

- Objektglass, 2 stk per prøve (gjenbruk glasset til utstryk dersom det rengjøres mellom hver prøve)
- Blyant for merking av glass
- Metallstativ
- Glassbeholder for etanolbad
- Etanol
- Esker for objektglass

#### Prosedyre:

1. Merk glasset med **blyant** (vanlig markeringspenn vil bli oppløst i etanol) (1-30).
2. Sett en liten bloddråpe foran skrivefeltet og et utstryksglass foran bloddråpen.
3. Dra glasset mot dråpen slik at den blir så vidt berørt og sprer seg langs kanten av glasset. Vinkel ca. 45° (Figur 3a)
4. Skyv utstryksglasset mot den motsatte siden av objektglasset med jevn, bestemt og litt rask bevegelse, dvs. dra blodet, ikke skyv. Riktig laget utstryk ender som en «tunge» og skal være forholdsvis tynt.
5. La utstryket ligge og tørke til prøvetakingen er ferdig.
6. Etter alle fisk er prøvetatt, sett utstrykene 10 om gangen i metallstativ og dypp i etanol i 30 sekunder. La de deretter lufttørke (Figur 3b)
7. Legg glassene fra hvert prøveuttak i hver sin merkede eske (følger med i prøvetakingsmaterialet). Legg et par ark tørkepapir over snittene så de ikke ristes under forsendelsen og fest lokket godt med tape.



Figur 3a og 3b. Metode for blodutstryk og fiksering i etanol

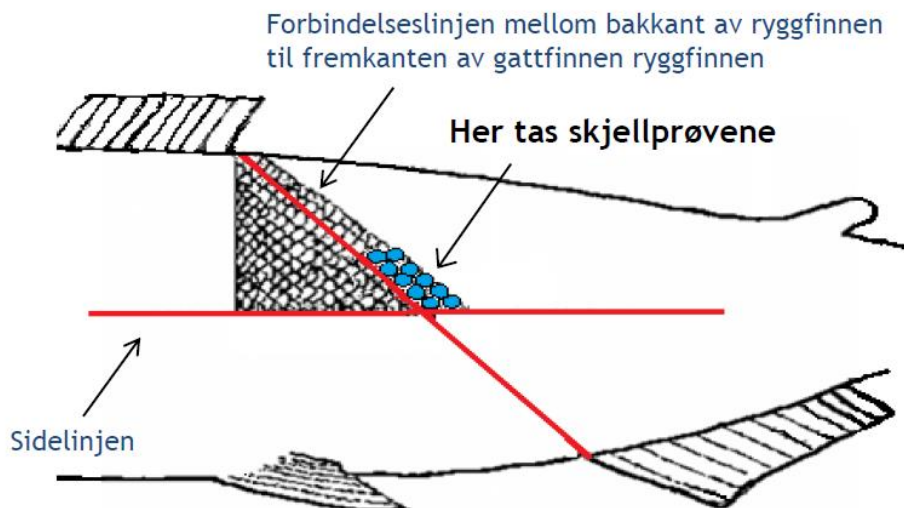
## Skjellprøve

### Utstyr (medfølger prøvepakken):

- Pinsett
- Papirlapp til å legge skjellene på
- Konvolutt

### Prosedyre:

1. 5 skjell plukkes enkeltvis fra hver fisk med pinsett fra 30 fisk
2. Skjellene plukkes fra ett bestemt område på fisken (Figur 4).
3. Legg skjellene fra hver fisk på en papirlapp. Denne brettes og legges i hver sin merkede konvolutt.



Figur 4. Sted på kroppen hvor skjellprøve skal tas.

## Vev på formalin, RNAlater og spesialbuffer

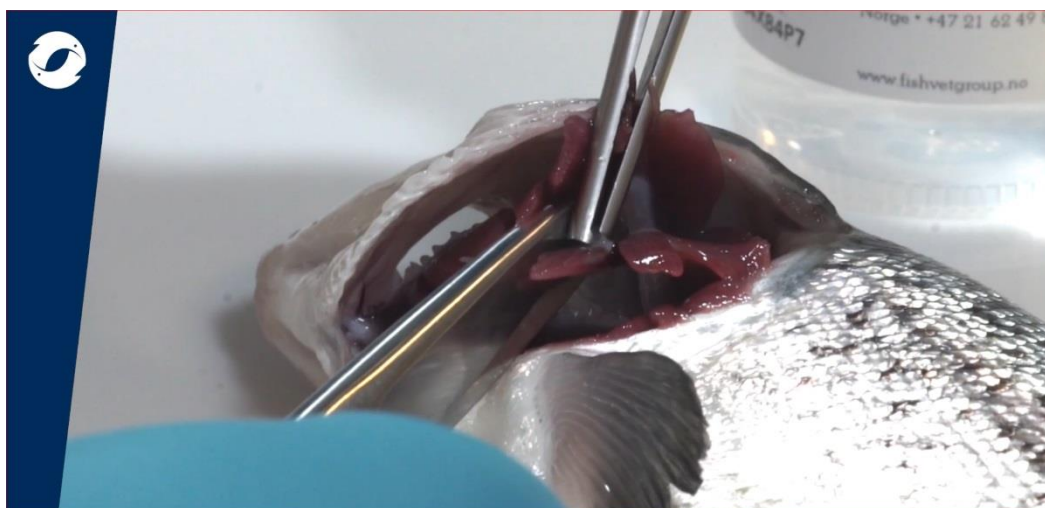
Utstyr (medfølger i prøvepakken\*):

- Formalinbeholdere, 1 per fisk
- RNAlater rør, 2 per fisk
- Rør med SEI buffer (\*rør til første prøveuttak ligger i prøvepakken, resten blir sendt ut før nye prøveuttak pga begrenset holdbarhet)
- Ekstra SEI buffer for rensing (flaske) og plastbeholder (f.eks. plastkopp)
- Disseksjonsutstyr (skalpell, saks og pinsett)

Det finnes video for detaljerte instruksjon i prøveuttak for PCR-undersøkelser og histopatologi via denne lenken <http://fishvetgroup.no/provetakingsvideoer/>

- 1. Prøvetaking av gjelle til smoltassay på RNA-later og spesialbuffer (SEI buffer).**
  - 1.1 Etter avliving tas det ut bit av 2. gjellebue på venstre side. (Figur 5a, 5b og 5c)
  - 1.2 Ett ca. 2 mm bredt segment av uttatt gjellepreparat legges på eget rør med RNA-later.
  - 1.3 En bit med 10-12 filamenter skylles i SEI buffer (flaske) og legges på tilsendt rør med SEI buffer.
- 2. Prøvetaking av gjelle til histologisk undersøkelse**  
Legg resten av 2. gjellebue på formalin.  
(Figur 6)
- 3. Prøvetaking av pseudobranchie til histologisk undersøkelse**  
Skjær ut hele pseudobranchien og legg på formalin (Figur 8)
- 4. Prøvetaking av hud og skjelettmuskulatur til histologisk undersøkelse**

- Ta ut en loddrett skive (ca. 4mm x 10mm x10 mm) på tvers av sidelinjen under ryggfinnen for å inkludere både rød og hvit muskulatur. Legg på formalin. (Figur 9a og 9b)
5. **Åpne opp til bukhulen** ved å skjære vekk venstre side av bukveggen (Figur 10)
  6. **Åpne opp til hjertehulen** og ta ut hele hjertet og legg på formalin (Figur 11)
  7. **Prøvetaking av lever til histologisk undersøkelse**  
Ta ut en skiveformet prøve fra lever og legg på formalin (Figur 12)
  8. Skjær ut bit av **pylorusblindsekkene og pankreas** (Figur 13)
  9. Skjær ut en del av **milten** og legg på formalin (Figur 14)
  10. Skjær vekk svømmeblæren for å eksponere nyret (Figur 15)
  11. **Prøvetaking av bakre halvdel av nyre til histologisk undersøkelse**  
Disseker ut nyrevevet fra midten (på nivå med ryggfinnen) og bakover og legg på formalin. (Figur 16).



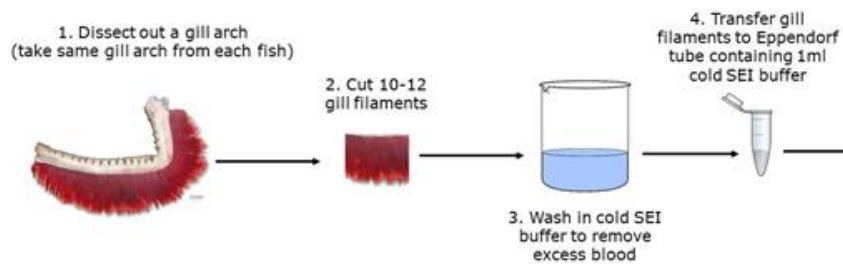
Figur 5a. Utklipping av bit av 2. gjellebue for SEI buffer (smolt assay).



Figur 5b. Utklippet bit av gjelle lagt på sterilt underlag (innsiden av skalpellinnpakningen).



Figur 5c. Tilskjæring av gjellebiten til ca. 2 mm brede segmenter



Figur 6. Metode for å ta ut gjellefilament på SEI buffer.



Figur 7. Gjellebit til histologi



Figur 8. Uttak av pseudobrankie til histologi





Figur 9a. Uttak av hud/skjelettmuskulatur til histologi



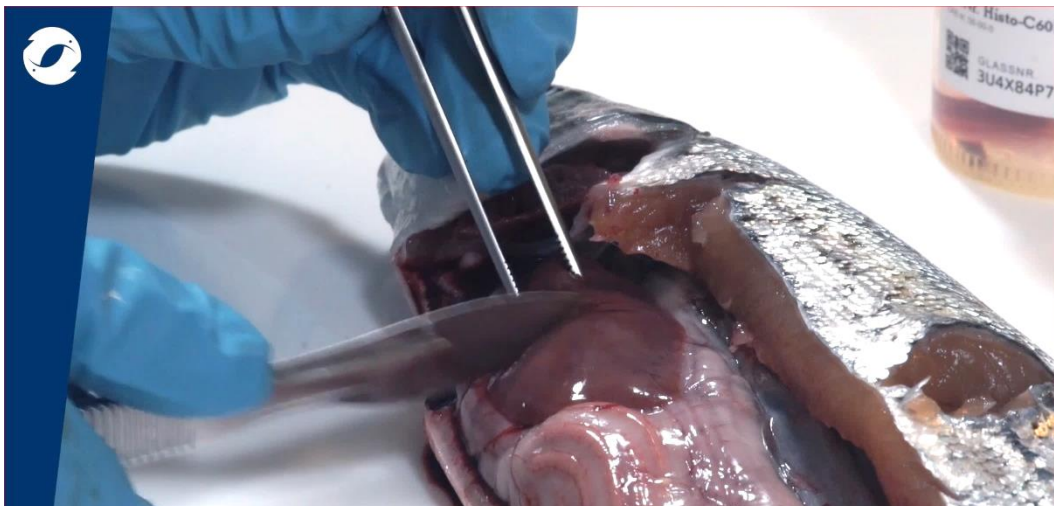
Figur 9b. Eksempel på hud/muskelbit uttatt til histologi



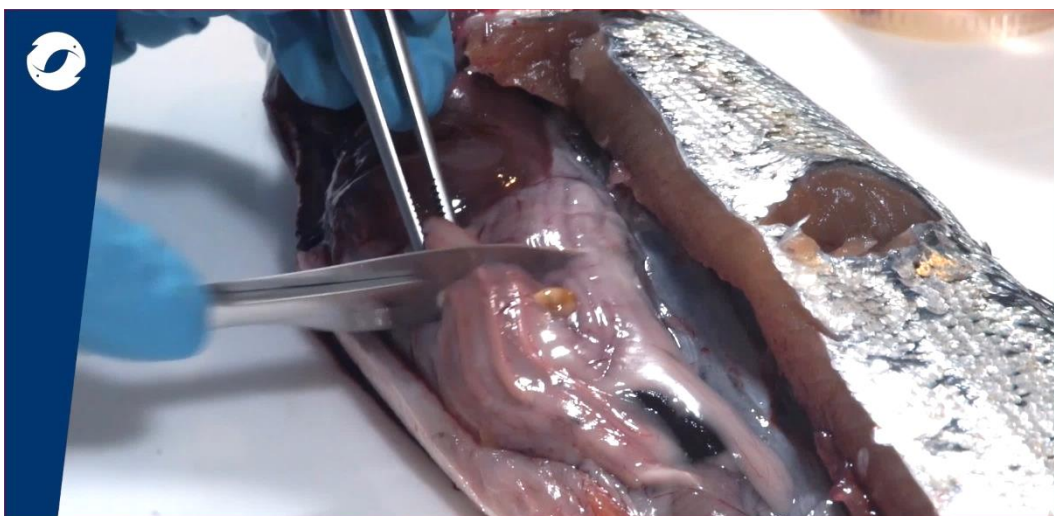
Figur 10. Åpning inn til bukhulen



Figur 11. Uttak av hjertet



Figur 12. Uttak av skiveformet preparat fra lever



Figur 13. Uttak av pylorusblindsekker og pankreas



Figur 14. Uttak av miltpreparat



Figur 15. Disseker vekk svømmeblæren for å komme til nyret



Figur 16. Disseker ut bakre halvdel av nyret til histologisk undersøkelse og legg på formalin

### Prøver av avleiringer/nyrestein:

Der det blir påvist avleiringer i nyre på obduksjon av fisken, tas det ut materiale i tomme eppendorfrør (ett rør per fisk, husk å merke disse tydelig med fiskenummer og dato).

### Forsendelse

Pakkes på is i isoporboks:

- Plasma
- Vev på RNAlater
- Vev på buffer

Pakkes uten is:

- Histologiglass
- Skjellprøver
- Beholdere med blodutstryk (lukk disse godt med tape, legg papir inni esken over glassene)
- Eppendorfrør med nyreavleiringer/nyrestein.
- Prøveskjema

1. Fyll inn prøvekjema ved å huke av vedlagt materiale. Pakk denne sammen med prøvene.
2. Bruk emballasjen materiale ble sendt i.
3. Pakker sendes snarest til Fish Vet Group sin leveringsadresse under med vedlagt returetikett for «ekspress over natt».

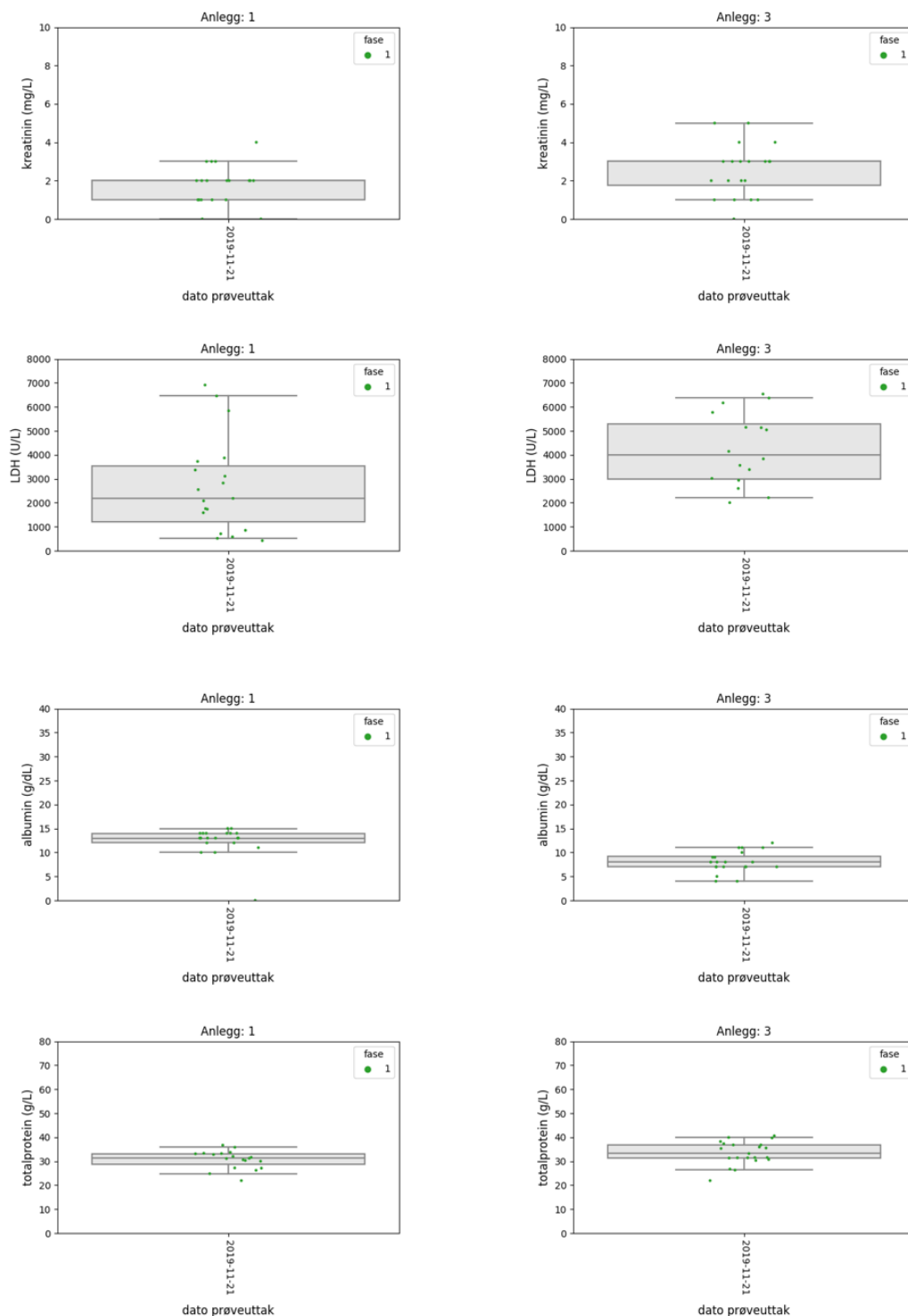
Ved spørsmål om prøveuttaket kontakt:

- Marianne Kraugerud, Fish Vet Group, tel: 97411990
- Anne Berit Olsen, Veterinærinstituttet: 90156348
- Mona Gjessing, Veterinærinstituttet: 91539958

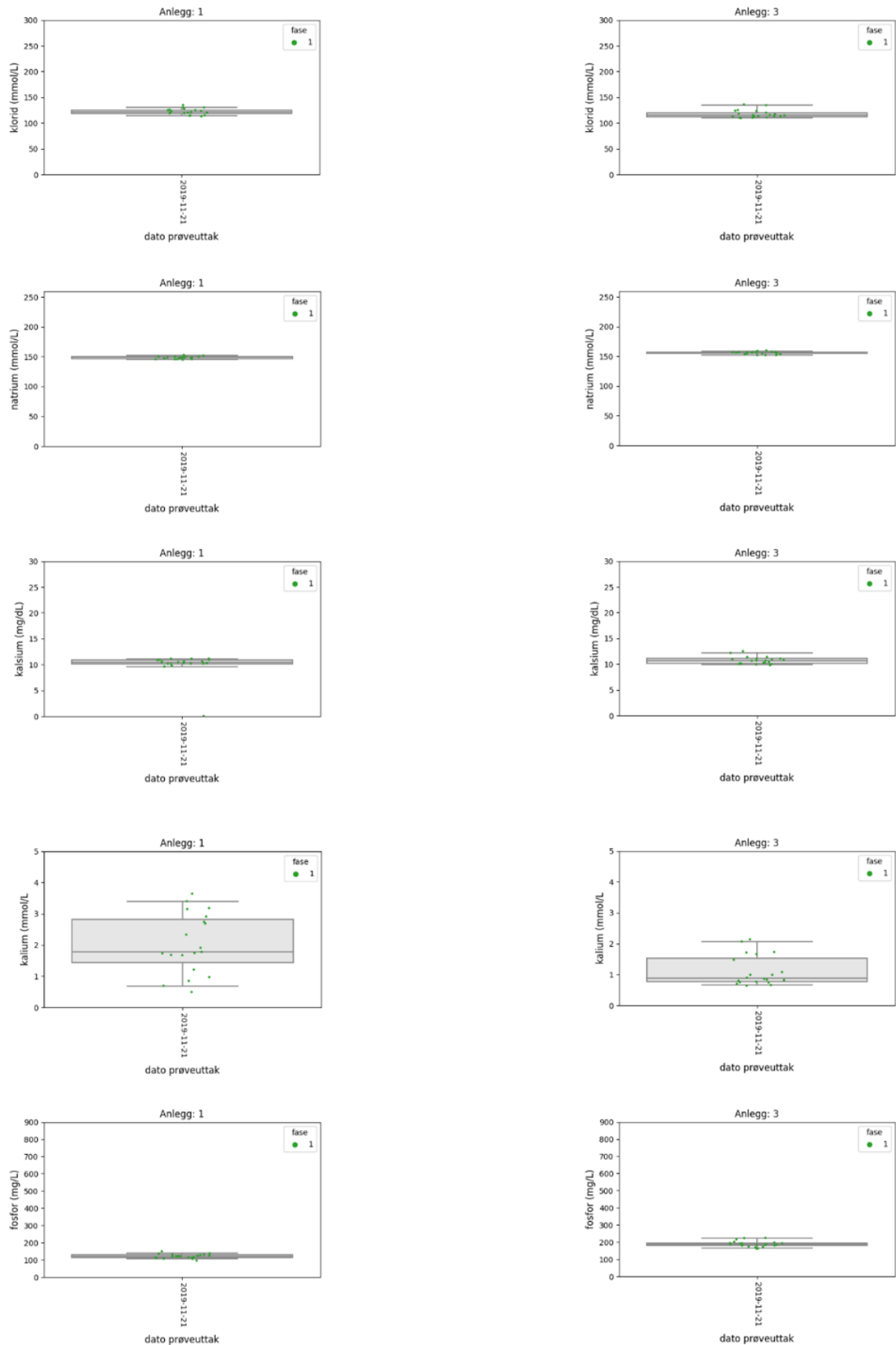
<b>Leveringsadresse:</b> Fish Vet Group Norge Hoffsveien 21-23 0275 OSLO	Pakkens sporingsnummer sendes til: <a href="mailto:post.fvgn@fishvetgroup.com">post.fvgn@fishvetgroup.com</a>
--------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 9.2 ANALYSER AV PLASMA FRA SETTFISKANLEGG (AP1)

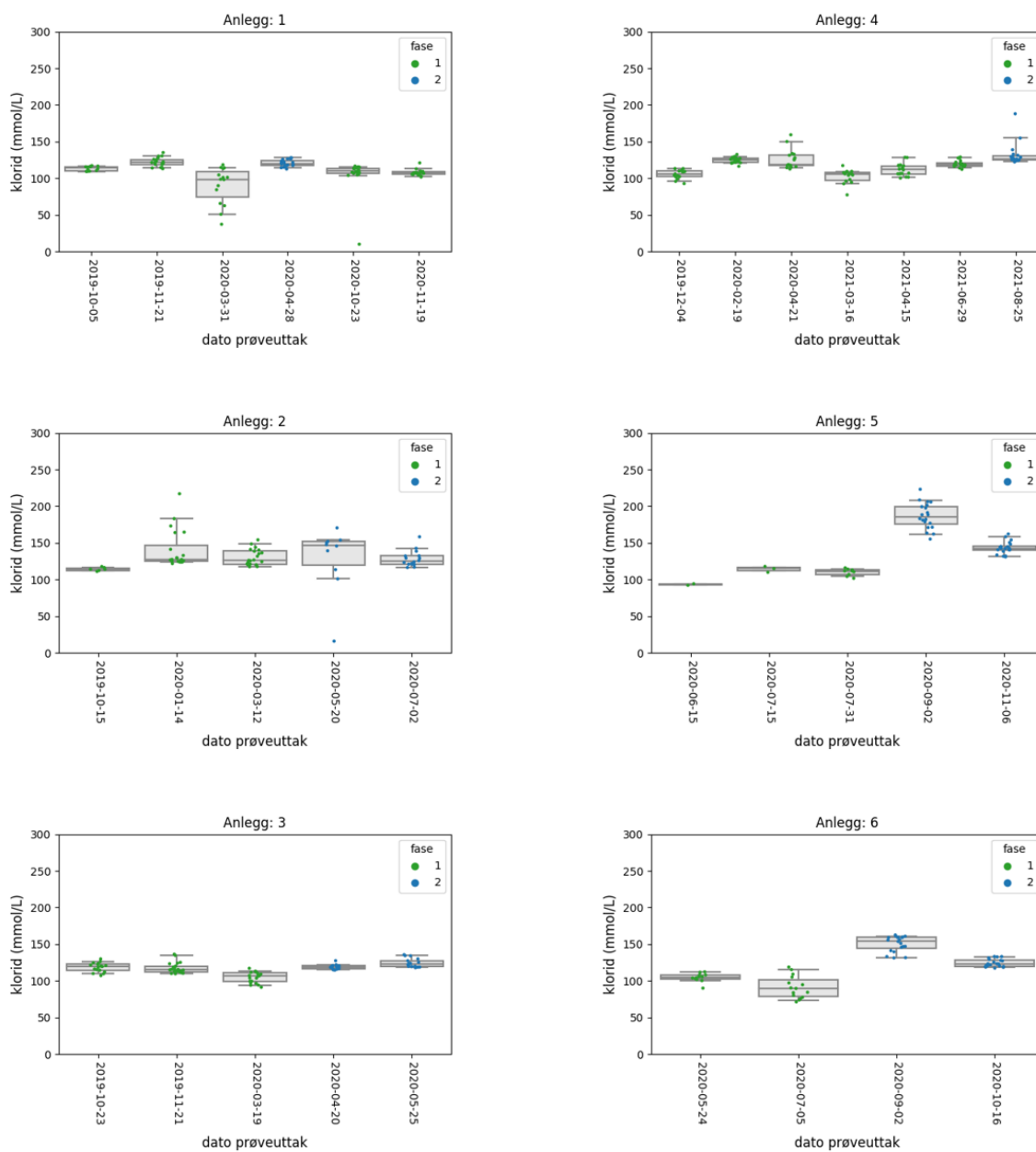
Av: Kai-Inge Lie<sup>4</sup>



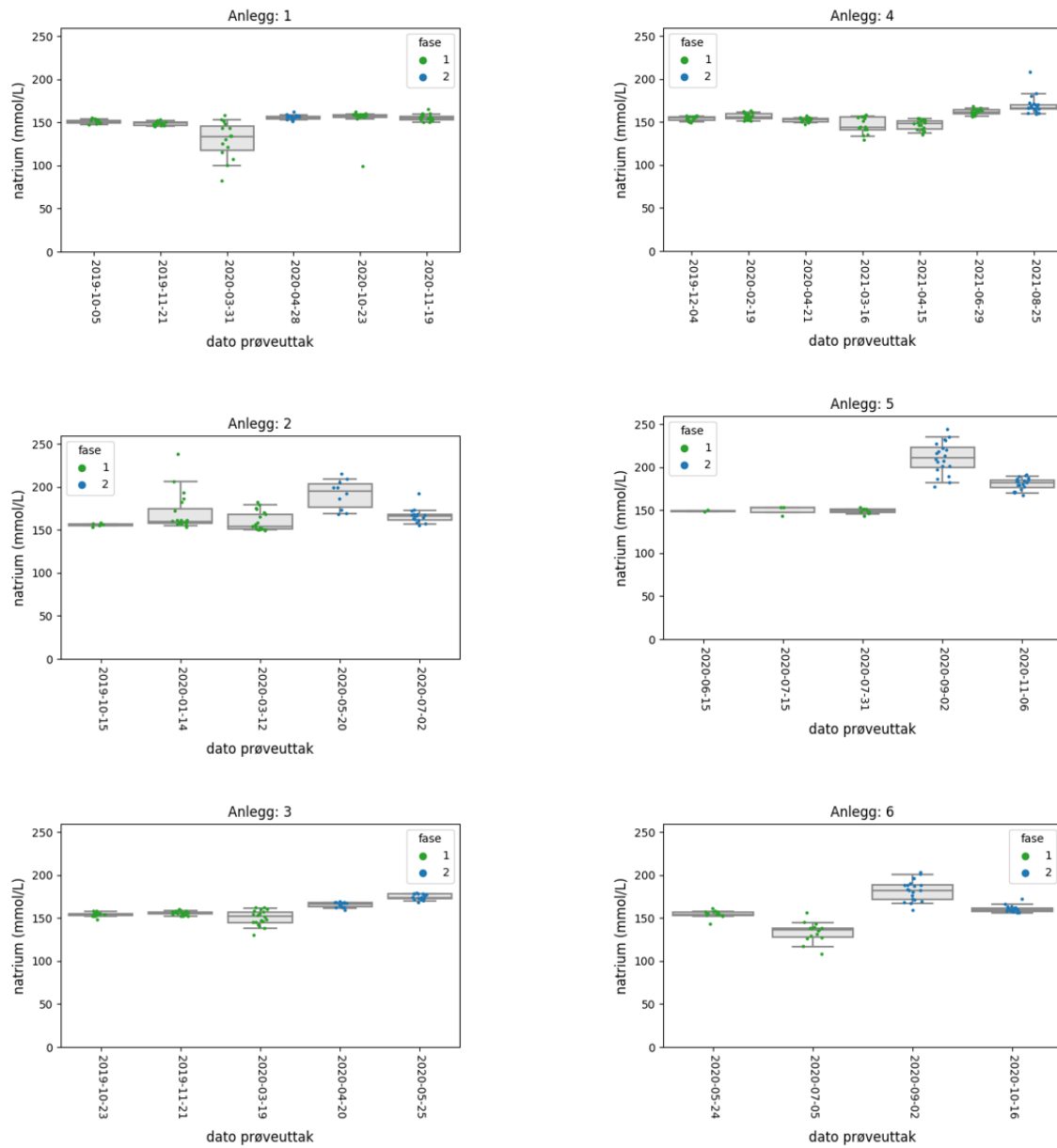
Figur 1. Klinisk kjemi pilotundersøkelse på settefisk: Analyseresultater for kreatinin, laktat dehydrogenase (LDH), albumin og totalprotein for 20 + 21 individer fra anlegg 1 (A) og 3 (C).



Figur 1. Klinisk kjemi pilotundersøkelse på settefisk: Analyseresultater for klorid, natrium, kalsium, kalium og fosfor for 20 + 21 individer fra anlegg 1 (A) og 3 (C). Fase 1 = settefisk

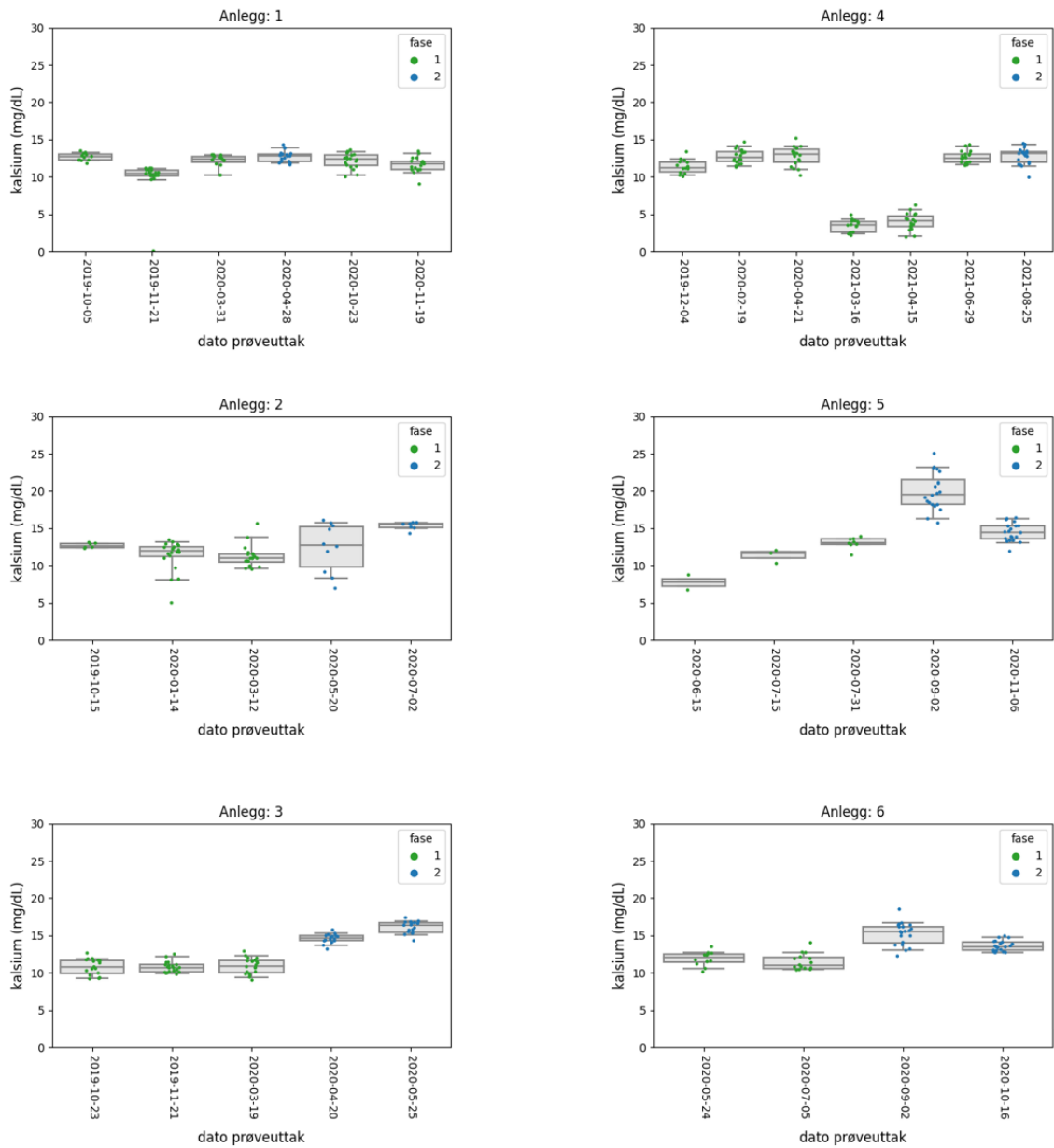


Figur 2. Klinisk kjemi undersøkelse på settefisk og sjøsatt fisk i hoveduttak: Analyseresultater for klorid for individer fra anlegg 1 – 6 (A til F). Fase 1 = settefisk og fase 2 = sjøsatt fisk

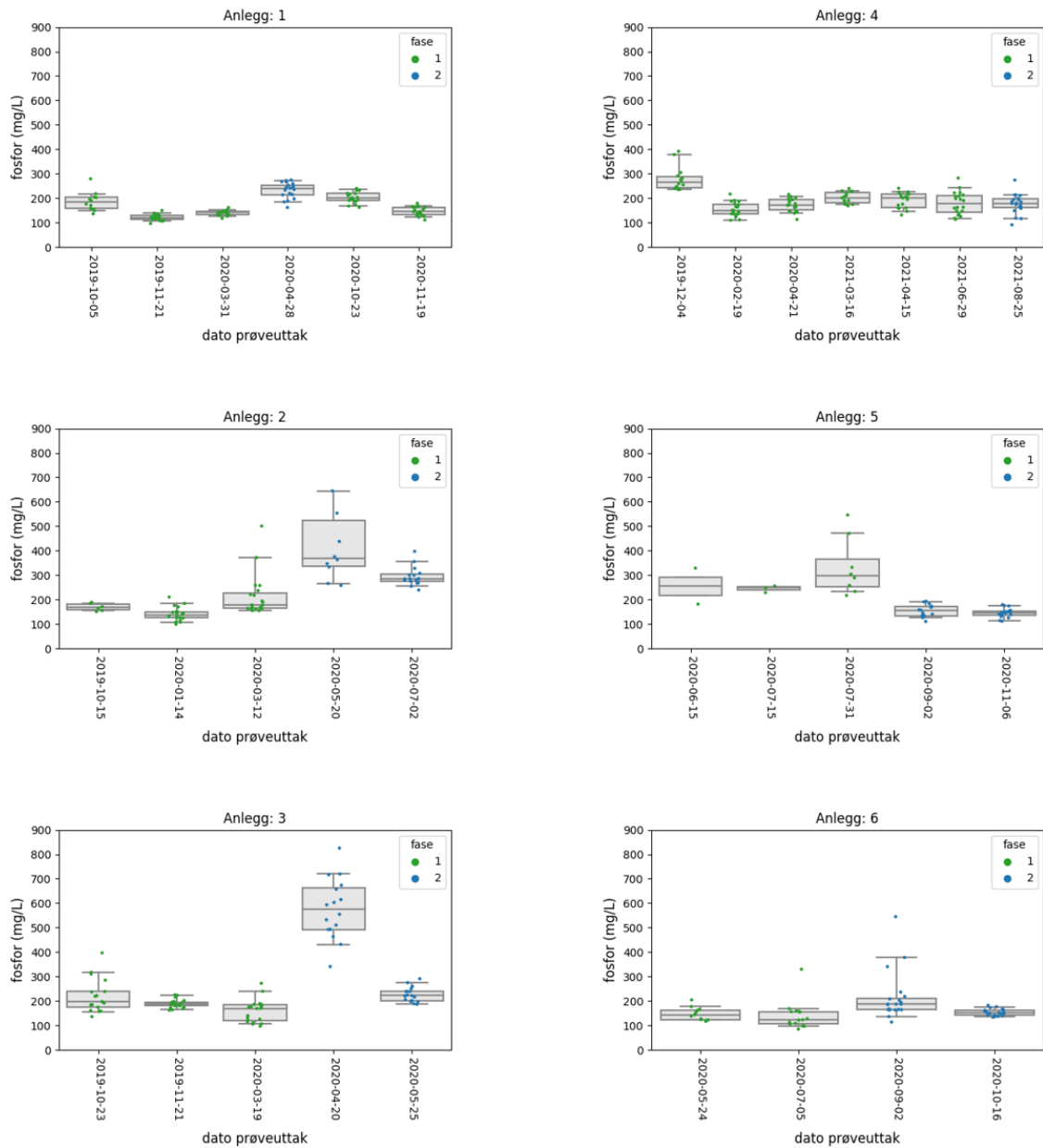


Figur 3. Klinisk kjemiundersøkelse på settefisk og sjøsatt fisk i hoveduttak: Analyseresultater for natrium for individer fra anlegg 1 – 6 (A til F). Fase 1 = settefisk og fase 2 = sjøsatt fisk

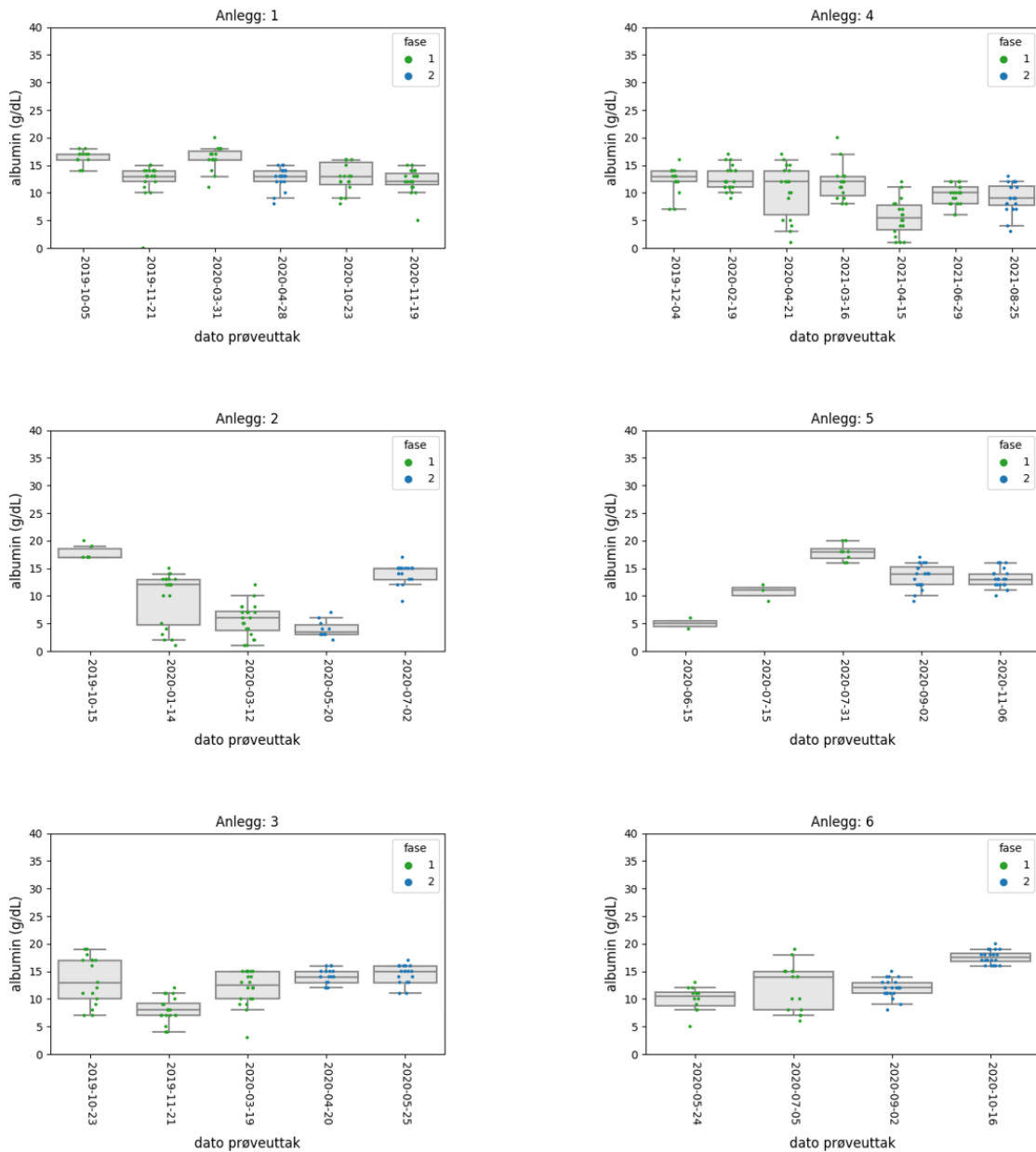




Figur 4. Klinisk kjemi-undersøkelse på settefisk og sjøfatt fisk i hoveduttak: Analyseresultater for kalsium for individer fra anlegg 1 – 6 (A til F). Fase 1 = settefisk og fase 2 = sjøfatt fisk



Figur 5. Klinisk kjemi-undersøkelse på settefisk og sjøsatt fisk i hoveduttak: Analyseresultater for fosfor for individer fra anlegg 1 – 6 (A til F). Fase 1 = settefisk og fase 2 = sjøsatt fisk



Figur 6. Klinisk kjemi-undersøkelse på settefisk og sjøfatt fisk i hoveduttak: Analyseresultater for albumin for individer fra anlegg 1 – 6 (A til F). Fase 1 = settefisk og fase 2 = sjøfatt fisk

Tabell over målt vannkvalitet i 5 av 6 settefiskanlegg som deltok i feltundersøkelsen

## Anlegg A

Dato	Sted	pH	Salinitet ‰	CO <sub>2</sub> anlegg mg/L	CO <sub>2</sub> mg/L	Total karbonat mg/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> mg/L	Alkalitet mM	TAN mg/L	NH3-N µg/L
15.10.2019	Innløp	6,6	0,5		2,8	6,3	3,6	0,00043	0,08	0,02	0,01
	Kar	6,1	0,5		12,4	17,8	5,5	0,00022	0,12		
	Avløp	6,1	0,5		13,9	19,3	5,4	0,00020	0,12	1,10	0,23
21.11.2019	Innløp	6,6	0,8	2,0	2,2	4,9	2,7	0,00003	0,06		
	Kar	6,2	0,8	7,0	6,0	9,1	3,1	0,00014	0,07		
	Avløp	6,3	0,8	7,0	5,9	9,1	3,2	0,00016	0,07		
10.12.2019	Innløp	6,6	0,8	1,0	2,0	4,6	2,6	0,00031	0,06		
	Kar 10	6,1	0,8	4,9	8,3	11,7	3,3	0,00012	0,07		
	Avløp 10	6,2	0,8	5,1	8,9	12,7	3,8	0,00015	0,09		
19.12.2019	Innløp	6,5	0,8	1,2	2,2	4,2	2,0	0,00017	0,05		
	Kar 10	6,5	0,8	4,5	5,7	11,0	5,3	0,00044	0,12		
	Avløp 10	6,1	0,8	4,7	8,8	12,1	3,2	0,00011	0,07		
02.01.2020											
Formiddag	Innløp	6,6	0,8	1,0	2,0	4,4	2,4	0,00025	0,05		
	Kar 10	6,3	0,8	5,3	8,2	13,0	4,8	0,00025	0,11		
	Avløp 10	6,2	0,8	5,4	8,7	12,8	4,0	0,00017	0,09		
	Kar 3	6,2	0,8	3,1	6,2	9,1	2,9	0,00012	0,06		
	Avløp 3	6,2	0,8	3,4	6,4	9,4	3,0	0,00012	0,07		
Ettermiddag	Innløp	6,7	0,8	1,0	1,7	4,3	2,5	0,00034	0,06		
	Kar 10	6,5	0,8	5,2	6,8	13,0	6,2	0,00052	0,14		
	Avløp 10	6,2	0,8	5,2	9,1	13,4	4,2	0,00018	0,10		
	Kar 3	6,6	0,8	3,1	4,1	8,8	4,7	0,00050	0,11		
	Avløp 3	6,3	0,8	3,4	5,8	9,2	3,4	0,00018	0,08		
17.02.2020	Innløp	6,8	0,8	1,0	1,5	4,2	2,7	0,00045	0,06		
	Kar 10	6,6	0,8	4,0	4,0	8,5	4,6	0,00048	0,10		
	Avløp 10	6,4	0,8	4,5	5,1	8,8	3,7	0,00025	0,08		
31.03.2020	Innløp	6,8	0,7	3,4	1,6	4,5	2,9	0,00048	0,07		
	Kar 10	6,8	0,8	3,5	2,7	7,7	5,0	0,00083	0,11		
	Avløp 10	6,8	0,8	3,8	3,3	9,3	6,1	0,00101	0,14		
				3,7	5,6						

## Anlegg B

Dato	Sted	pH	Salinitet ‰	CO <sub>2</sub> anlegg mg/L	CO <sub>2</sub> mg/L	Total karbonat mg/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> mg/L	Alkalitet mM
17.10.2019	Innløp	7,1	0	1,0	1,7	9,3	7,6	0,0030	0,17
	Kar	6,5	1,05	10,0	11,3	22,3	11,0	0,0010	0,25
	Avløp	6,4	1,05	12,0	13,1	24,5	11,4	0,0009	0,26
14.01.2020	Innløp	7,1	15,8	5,0	7,3	61,8	54,4	0,1470	1,24
	Kar	7,1	15,93	6,0	7,0	61,4	54,3	0,1540	1,24
	Avløp	7,1	15,91	6,0	7,4	63,7	56,1	0,1550	1,28

Vedlegg 9.3 Side 2

Tabell over målt vannkvalitet i 5 av 6 settefiskanlegg som deltok i feltundersøkelsen

Anlegg C RAS

Dato	Sted	pH	Salinitet ‰	CO <sub>2</sub> anlegg mg/L	CO <sub>2</sub> mg/L	Total karbonat mg/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> mg/L	Alkalitet mM	TAN mg/L	NH <sub>3</sub> -N µg/L
23.10.2019	Innløp	7,3	0,1	4,0	4,8	41,6	36,7	0,02660	0,84	0,37	1,19
	Kar	7,2	0,1	5,0	6,8	43,2	36,4	0,01870	0,83		
	Avløp	7,1	0,1	5,0	7,6	43,9	36,3	0,01660	0,82		
22.11.2019	Innløp	7,3	2,4	5,0	4,3	32,2	27,9	0,01720	0,63	0,22	0,73
	Kar	7,1	2,2	3,0	5,7	31,0	25,3	0,01080	0,58		
	Avløp	7,1	2,2	3,0	5,9	31,2	25,3	0,01030	0,57		
19.12.2019	Innløp	7,1	0	5,0	10,4	60,3	49,9	0,02300	1,13		
	Kar	7,2	0	6,0	8,3	58,3	49,9	0,02900	1,14		
	Avløp	7,2	0	6,0	9,2	58,5	49,3	0,02550	1,12		
27.01.2020	Innløp	7,3	0,1	6,0	7,9	71,1	63,1	0,04800	1,44		
	Kar	7,1	0,1	7,0	11,6	68,4	56,8	0,02700	1,29		
	Avløp	7,1	0,1	7,0	12,1	68,9	56,7	0,02600	1,29		
26.02.2020	Innløp	7,7	0,1	4,0	3,1	71,5	68,2	0,14900	1,56		
	Kar	7,4	0,1	7,0	8,9	109,0	100,0	0,11200	2,28		
	Avløp	7,4	0,1	8,0	9,4	108,0	98,5	0,10300	2,24		
23.03.2020	Innløp	7,3	0,2	2,0	4,0	29,6	25,6	0,01510	0,58	0,28	0,42
	Kar	7,0	0,2	7,0	8,2	34,2	26,0	0,00750	0,59		
	Avløp	6,9	0,2	7,0	9,6	35,5	25,9	0,00640	0,59		

Anlegg C Gjennomstrømming

Dato	Sted	pH	Salinitet ‰	CO <sub>2</sub> anlegg mg/L	CO <sub>2</sub> mg/L	Total karbonat mg/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> mg/L	Alkalitet mM
27.01.2020	Kar	6,0	0	7,0	5,1	6,6	1,5	4,23000	0,23

Anlegg E

Dato	Sted	pH	Salinitet ‰	CO <sub>2</sub> anlegg mg/L	CO <sub>2</sub> mg/L	Total karbonat mg/L	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/L	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> mg/L	Alkalitet mM
30.01.2020	Innløp	6,7	0	1,0	1,3	3,9	2,6	0,00047	0,06
	Kar 1	6,2	0	9,0	9,2	14,8	5,6	0,00032	0,13
	Avløp 1	5,2	0	11,0	10,3	16,1	5,8	0,00031	0,13
	Kar 11	6,2	0	9,0	8,8	14,3	5,4	0,00032	0,12
	Avløp 11	6,2	0	10,0	10,4	16,2	5,8	0,00032	0,13
15.06.2020	Kar	6,2	0	11,8					
	Avløp	6,2	0	13,1					

Anlegg F

Dato	Sted	pH	Salinitet ‰	CO <sub>2</sub> anlegg mg/L
30.01.2020	Innløp	6,1	0,05	4,0
	Kar	7,0	3,17	11,0
	Avløp	7,1	3,15	11,0

## 9.4 Opplysninger om fiskegrupper og anlegg som deltok i AP1

Av: Arve Nilsen

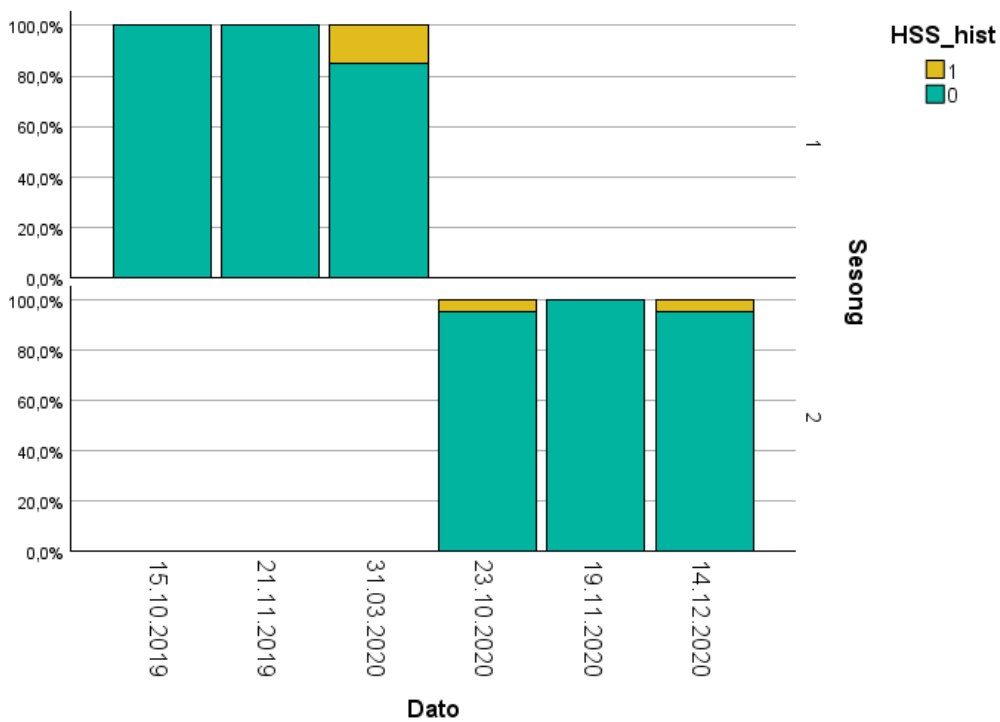
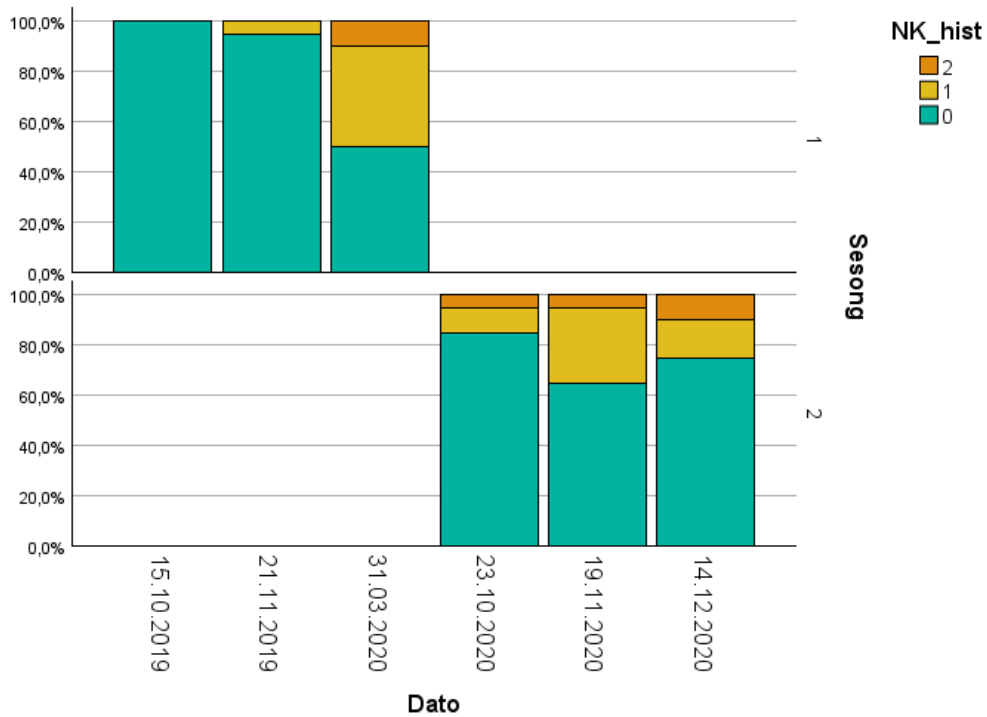
Tabell 1. Oversikt over anlegg som deltok i prosjektet og driftsdata for de aktuelle fiskegruppene. RAS = resirkulering, GS = gjennomstrømming. Samlet prevalens (% fisk i alle uttak) med NK og HSS er også oppgitt.

Anlegg	A	B	C	D	E	F
Type	GS	GS	RAS og GS	RAS	GS	RAS
Buffer	Sjøvann	Sjøvann	Salt	Sjøvann		Ca(OH) <sub>2</sub> og NaOH, litt sjøvann
Salinitet (promille)	0,5 - 1	≤ 19	0,4 – 3,5	0,1 - 15	0	1 - 3
Smoltprotokoll	Lysstyring	Lysstyring	Lysstyring	Salinitet eller smoltfôr	Kontinuerlig lys og smoltfôr	Kontinuerlig lys og smoltfôr
Prevalens NK	20,0	14,4	8,3	64,2	55,0	47,1
Prevalens HSS	3,8	22,5	1,4	14,3	3,3	17,2

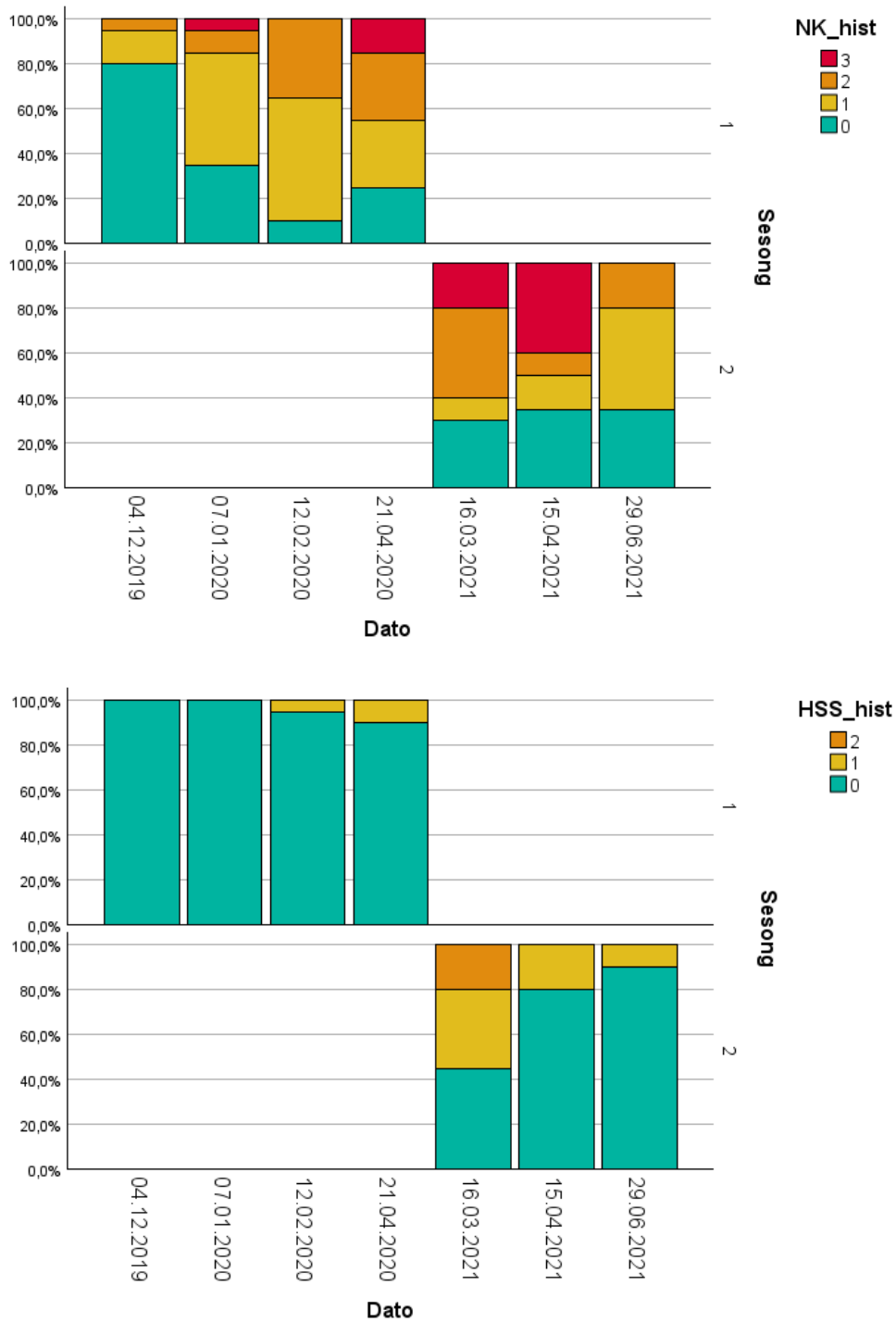
Tabell 2. Utsettsgrupper som var med i prosjektet, periode for prøvetaking, temperatur ved start og slutt av prøvetaking (T1 og T2), snittvekt (g) start og slutt (W1 og W2).

Anlegg	Periode for prøvetaking i settefiskanlegget	T1	T2	W1 (g)	W2 (g)
A1	15.10.2019 – 31.03.2020	9,9	3,7	70	137
A2*	23.10.2020 – 14.12.2020	9,1	13,8	79	102
B	15.10.2019 – 12.03.2020	10,1	5,0	61	230
C	23.10.2019 – 19.03.2020	12,0	7,9	60	181
D1	14.12.2019 – 21.04.2020	14,0	12,8	50	212
D2	16.03.2021 – 29.06.2021	12,7	14,0	52	153
E	15.06.2020 – 31.07.2020	14,0	14,3	33	77
F	14.04.2020 – 05.07.2020	11,0	11,0	49	116

\*: Denne fisken ble flyttet over til Forsøk 2, ILAB.



Figur 1: Anlegg A, forekomst av NK (øverst) og HSS, nederst, fordelt på to sesonger med uttak. Fisken som ble fulgt i Sesong 2 ble levert videre til forsøk 2 (Se også analyse av ukeprøver i Kap. 2 og data fra forsøk 2 i Kap. 4).



Figur 2: Anlegg D, forekomst av NK (øverst) og HSS, nederst, fordelt på to sesonger med uttak.



# Nefrokalsinose hos laksesmolt under eksperimentelle forhold – en patologisk studie

Anne Berit Olsen<sup>1</sup>, Sveinung Fivelstad<sup>2</sup>, Merete Gåsvar Sture<sup>1</sup>, Kari Sandnes<sup>1</sup>, Henriette Kvalvik<sup>1</sup>, Torill Thoreby Jensen<sup>1</sup>, Camilla Diesen Hoffeld<sup>2</sup>, Ingunn Sommerset<sup>1</sup>, Arve Nilsen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veterinærinstituttet (e-post: anne-berit.olsen@vetinst.no), <sup>2</sup>Høgskolen på Vestlandet (e-post: sveinung.fivelstad@hvl.no)

## INTRODUKSJON

Nefrokalsinose (nyrestein) er kjennetegnet ved utfelling av kalkholdig materiale i nyrets ekskresjonssystem, der urinen dannes. Sykdommen er ikke smittsom, men utvikles under suboptimale betingelser for fiskens fysiologi og blir oftest påvist i settefiskfasen. Ved uttalt skade på nyret er sykdommen dødelig. Posteren presenterer forekomst og patologiske funn ved sykdommen under eksperimentell eksponering for høye nivåer av CO<sub>2</sub> og kombinert høy CO<sub>2</sub> og overmetning av O<sub>2</sub> i ferskvann og etter overgang til sjø.

## MATERIALE OG METODER

Parr av Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) ble delt i tre grupper, hver med to replikater. Konsentrasjonen av CO<sub>2</sub> var 3 mg·L<sup>-1</sup> i kontrollgruppen og i overkant av 20 mg·L<sup>-1</sup> for de to eksperimentelle gruppene. Den ene av disse gruppene ble også utsatt for forhøyet konsentrasjon av oksygen (ca. 125 %). Vanntemperaturen var 5°C og fisken ble utsatt for et 24 timers lysregime for å indusere smoltifisering. Observasjonsperioden i ferskvann var 76 d. Forsøket ble avsluttet etter 6 uker i sjø. Sekvensielle uttak av blod- og vevsprøver ble utført og vekst registrert. Utfelling i nyre ble scoret som milde (funn i 1-5 lumina), moderate (6-20), uttatte (21-40) og svært uttatte (>41).

## RESULTATER

Prevalensen av nefrokalsinose basert på histopatologisk undersøkelse var høyere i de to eksperimentelle gruppene sammenlignet med kontrollgruppen (p<0,05), men ikke signifikant forskjellig mellom de to gruppene. Det ble også påvist utfelling av kalkholdig materiale i pseudobrank og magesekkevegg hos noen fisk.

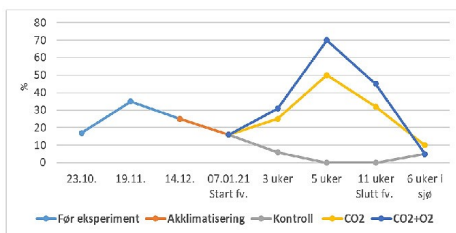


Fig. 1. Utviklingen av nefrokalsinose fra observasjonsperiode i felt til d 113 (6 uker i sjø). NFK forsvant i kontrollgruppen, men økte i eksponerte grupper (ikke signifikant forskjellig). Høyest prevalens etter 5 uker. Svært få funn etter 6 uker i sjø. 65 % i eksponeringsperioden var milde funn, 33 % moderate og 2 % (1 fisk) uttalt.

## DISKUSJON

Det var høy forekomst av utfelling av kalkholdig materiale i nyrets ekskresjonssystem i begge de CO<sub>2</sub>-eksponerte gruppene. Reaksjonen utviklet seg raskt, dvs. i løpet av 3-5 uker. Både et lavt CO<sub>2</sub>-nivå og opphold i sjøvann virket avhelende på tilstanden. I et flertall av tilfellene var det bare milde funn.

Mild og moderat nefrokalsinose var bare unntaksvis synlig ved obduksjon. Dette bekrefter erfaringene fra sykdomsdiagnostiske undersøkelser der nefrokalsinose (og utfelling i pseudobrank og magesekkevegg) ofte er et tilleggfunn og derfor også underdiagnostisert. Kalkholdige utfelling er et endepunkt for fysiologisk ubalanse. Prosjektet pågår og flere analyseresultater er underveis.

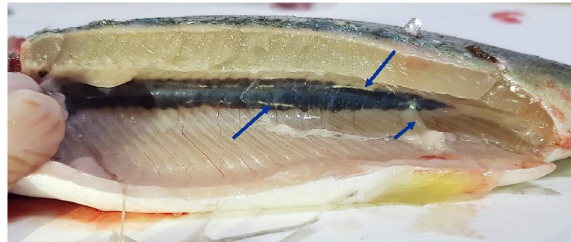


Fig. 2. Synlige utfelling i nyrets ekskresjonssystem, der urinen dannes (lange piler). De fleste fiskene hadde utfelling som ikke var synlige ved obduksjon. Urinblære (kort pil).

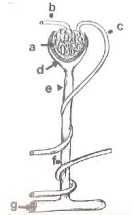


Fig. 3. Ekskresjonssystemet = nefron. a glomerulus, b blodåre til c blodåre fra, d Bowmans kapsel, e proximale tubulus, f distale tubulus, g samlerør (ref. Amin m.fl. Histologisk Atlas)

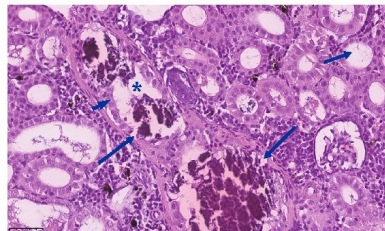


Fig. 4. Samlerør med kalkholdig materiale (\*) og ødelagt epitel (lang pil). Epitel (pilhode). Lumen av tubuli er utvidet pga. tilstopping (kort pil)

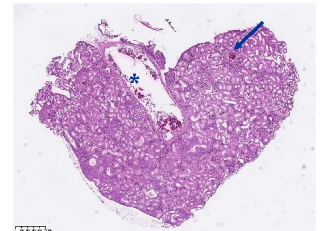


Fig. 5. Nyre 4 oversikt. Dilatert samlerør med kalkholdig materiale (\*). Pil viser område for fig. 4.

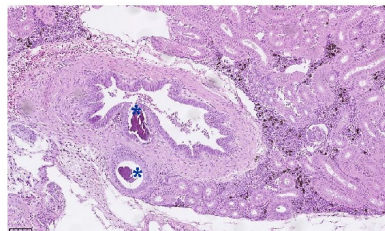


Fig. 6. En av de to urinlederne ved overgangen til urinblære. Kalkholdig materiale (\*).

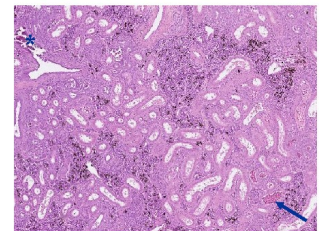


Fig. 7. Kalkholdig materiale (\*). Fisken hadde også HSS med blødning til tubuli (pil)

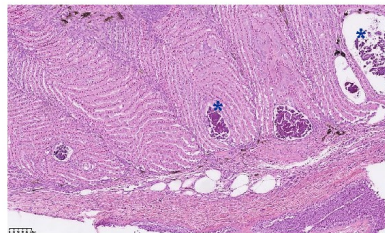


Fig. 8. Pseudobrank med flere større områder med kalkholdige utfelling (\*).

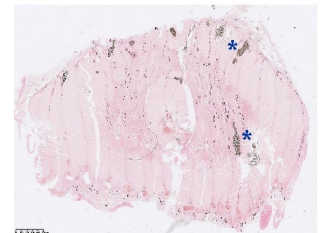


Fig. 9. Pseudobrank. Ved von Kossa-farging er mørk brunfarge indikasjon på kalk (\*).

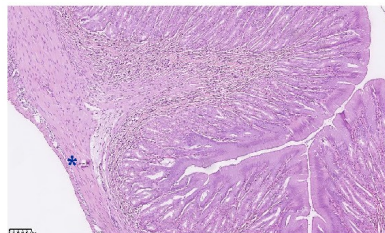


Fig. 10. Magesekkevegg med små kalkholdige utfelling (\*).



Fig. 11. Tverrsnitt av magesekken.

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



*Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!*



**Veterinærinstituttet**  
Norwegian Veterinary Institute

Ås

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no  
www.vetinst.no