

Epidemiologisk studie av sammenhenger mellom melanin i filét hos laks og virusinfeksjoner og andre produksjonsvariabler



Epidemiologisk studie av sammenhenger mellom melanin i filét hos laks og virusinfeksjoner og andre produksjonsvariabler

Faglig sluttrapport (FHF#901256)

Innhold

1.	Sammendrag	2
2.	Summary in English.....	4
3.	Bakgrunn	6
4.	Målsetting	6
5.	Materiale og metoder	7
5.1.	Datasekk 1	7
5.2.	Datasekk 2.....	7
5.3.	Datasekk 3.....	8
5.4.	PatoGen - screeningdata	8
5.5.	Veterinærinstituttet - sykdomsdiagnoser	8
5.6.	Databehandling	9
5.7.	Statistisk metode	9
6.	Resultater	11
6.1.	Prevalensen av melaninflekker per år og generasjon	12
6.2.	Effekt av sesong for utsett i sjø	14
6.3.	Effekt av tid i sjø	14
6.4.	Effekt av dødelighet, virussykdom og håndtering	17
6.5.	Effekt av helsefôr	27
6.6.	Regresjonsanalyse av risikofaktorer.....	28
6.6.1.	Datasekk 1.....	30
6.6.2.	Datasekk 2.....	32
6.6.3.	Datasekk 3.....	34
7.	Diskusjon	37
7.1.	Forskjeller i registreringer av melanindata	37
7.2.	Identifikasjon av risikofaktorer i de ulike datasettene	38
7.3.	Data på merdnivå gi høyere oppløsning	40
7.4.	Fremstilling av melanindata	41
7.5.	Forslag til longitudinell studie av faktorer som påvirker melaninprevalensen	41
8.	Konklusjon	42
9.	Takk til bidragsytere	42
	Referanser	43

Forfattere

Morten Lund, Eystein Skjerve, Lars Qviller, Thijs Christiaan van Son, Atle Lillehaug, Anja B. Kristoffersen, Edgar Brun

Oppdragsgiver:

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)

Samarbeidspartner:

NMBU Vet., NOFIMA, Bremnes Seashore, Marine Harvest og PatoGen

ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2018 / ©

Design omslag: Anne Haukland

Foto forside: Morten Lund

1. Sammendrag

Pigmentflekker i filét er et betydelig problem i norsk lakseoppdrett og innebærer en stor kostnad for produsentene. Det er gjennomført betydelig innsats for å identifisere årsaken til dannelsen av flekkene og det er funnet mulige sammenhenger mellom flere faktorer og tilstedeværelse av flekker i filét hos atlantisk laks.

I denne rapporten presenteres resultatene av et epidemiologisk studie av retrospektive data i tre forskjellige datasett hentet inn hhv av NOFIMA og to oppdrettsselskaper. Formålet med prosjektet var å vurdere kvaliteten til datasettene for å se om de kunne benyttes til å identifisere mulige risikofaktorer for tilstedeværelsen av melaninflekker i filét hos sjøvannsoppdrettet atlantisk laks.

Resultatene viser at når melaninprevalensen fremstilles per fiskegenerasjon, får en et mer nyansert bilde av utviklingen av flekker over tid da én fiskegenerasjon kan slaktes over to kalenderår. Det å strukturere melaninprevalensen per fiskegenerasjon er også nødvendig i epidemiologiske studier som skal indentifisere risikofaktorer for tilstedeværelse av flekker da produksjonsdata er strukturert per fiskegenerasjon. Det å strukturere melanindata per fiskegenerasjon vil også avsløre fisk som har blitt flyttet mellom sjølokaliteter i løpet av vekstfasen. Disse fiskegruppene vil det være viktig å ekskludere fra epidemiologiske studier siden disse fiskegruppene mangler fullstendige produksjonsdata fra utsett i sjø og har fått en annen håndtering sammenlignet med fisk som har stått på samme lokalitet siden utsett i sjø.

Frekvensen av prevalensen av melaninflekker i datasettene var forskjellig (datasett 1 og 2 vs datasett 3) og mellom slaktepartier fra samme merd. Dette kan trolig forklares med ulik metode for registrering av melaninflekker, opplæring og oppfølging av personellet som registrerer flekker, hvilke fisk som selekteres til filétering og varierende produksjonsmål på slakteriene. Datasett 1 og 2 brukte en registreringsmal etablert av NOFIMA i forbindelse med et tidligere FHF prosjekt (heretter kalt FHF-malen) for å registrere flekker mens datasett 3 brukte en ja/nei-metode. FHF-malen er detaljert og dette påvirker trolig krav til opplæring og fokus hos personellet som utfører registreringene og kan generere data som er mer pålitelige.

Det vil også være nødvendig å avklare hvorvidt prevalensen av flekker som registreres på filéter er representativ for hele populasjonen av laks på lokaliteten. Dette er viktig å finne ut siden data om risikofaktorene er hentet fra hele populasjonen. Eventuelle forskjeller i prevalens av flekker mellom den selekterte populasjonen som blir filétert og hele populasjonen kan påvirke resultatene en får når en undersøker hvilke risikofaktorer som påvirker prevalensen av flekker.

Dataene på melaninprevalens og risikofaktorene (produksjonsinformasjon og sykdomsdiagnoser) i dette prosjektet er hentet inn på lokalitetsnivå. Siden det vil være stor variasjon mellom merder i produksjonsparametere som registreres i løpet av tiden i sjø, vil det å ha data på lokalitetsnivå redusere den statistiske styrken til resultatene i epidemiologiske studier. Årsaken til dannelsen av melaninflekker i filét hos laks er trolig multifaktoriell. Det er derfor nødvendig å ha data med høy nok oppløsning for kunne sikre pålitelige resultater og øke sannsynligheten for å identifisere nøkkel-faktorer som kan bidra i dannelsen av melaninflekker. Fremtidige studier bør derfor designes slik at data blir håndtert på merdnivå og på en måte som muliggjør å følge informasjonsflyten om fisken i de enkelte merdene fra utsett i sjø til slakt. På denne måten kan en plukke opp enkelt-hendelser og/eller -faktorer som kan forklare forskjeller i prevalensen mellom merder, mellom lokaliteter fra samme produsent, mellom produsenter og mellom fiskegenerasjoner.

Multivariabel-analysen som ble utført i dette prosjektet identifiserte forskjellige risikofaktorer assosiert med melaninflekker i laksefilét. I datasett 1 var PD- og HSMB-status, sesong ved utsett og antall måneder i sjø negativt og signifikant assosiert med prevalens av flekker. Snittvekt ved utsett var positivt og signifikant assosiert med melaninprevalensen i datasett 1. I datasett 2 var håndteringsdødelighet og andel systemiske helsefôr negativt og signifikant assosiert med prevalensen av flekker. Videre var prevalensen av flekker positivt og signifikant assosiert med antall måneder i sjø i datasett 2. I datasett 3 var prevalensen av flekker

negativt og signifikant assosiert med CMS-status og alder ved utsett (1-åring). Lengdegrad og alder ved utsett (1.5-åring) var positivt og signifikant assosiert med prevalensen av flekker i datasett 3.

Dette viser at tilstedeværelsen av melaninflekker i filét er multifaktoriell og risikofaktorene for melaninflekker varierer mellom forskjellige datasett. En generell trend som kommer frem i alle datasettene er at prevalensen av flekker påvirkes av faktorer som påvirker immunresponsen til laksen, enten direkte ved virusinfeksjon eller indirekte ved bruk av systemiske helsefôr. Utsett som har en, to eller tre virusdiagnoser i løpet av tiden i sjø viser en trend mot høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som ikke har fått diagnostisert en virussykdom. Den positive effekten av økt andel utfôret systemiske helsefôr observert i datasett 2 baserer seg på grove data og må bekreftes i mer detaljerte studier. Analysene viser også en trend mot at prevalensen av flekker øker når et utsett har flere virusdiagnoser eller har en virusdiagnose i kombinasjon med håndteringsdødelighet. Det samme ble registrert i et annet studie og må undersøkes nærmere i mer detaljerte studier.

Resultatene fra dette prosjektet gir viktig informasjon om hvordan melaninflekker bør registreres og håndteres og hvordan produksjonsdata bør struktureres for å kunne brukes i slike epidemiologiske studier. Dette vil øke mulighetene for å identifisere risikofaktorer for melaninflekker i laksefilét og derfor bedre sjansen for å igangsette effektive preventive tiltak.

2. Summary in English

Pigmented spots in filets are a significant problem in Norwegian salmon aquaculture and causes large economic costs for the salmon producers. A significant effort has been performed to identify the cause of the spots and several risk factors have been associated with the formation and the presence of spots in Atlantic salmon filets.

The results of a retrospective epidemiological study are presented in this report. The data consisted of three different datasets originated from NOFIMA and two commercial salmon producers. The purpose of this project was to evaluate the quality of the datasets to see if they could be used to identify possible risk factors associated to the presence of melanised spots in filets from seawater reared farmed Atlantic salmon.

The results in this study reveal that the prevalence of spots should be presented per fish generation. This gives a more detailed picture of the development of spots in time because one fish generation can be slaughtered over two years. It is also necessary to structure the prevalence of melanised spots on fish generation in epidemiological studies aiming to identify risk factors for spots because production data (i.e. the risk factors) is structured in this way. Furthermore, this will also reveal fish that have been transferred between seawater locations during the grow-out phase. These groups need to be excluded from an epidemiological study due to lack of complete production data from seawater transfer.

The frequency of the prevalence of melanised spots in the datasets was different (dataset 1 and 2 vs dataset 3) and between slaughter batches originating from the same cage. This may be due to different registration methods of spots, varying training and follow-up of the personnel that perform the registration, the degree of selection of fish that are fileted and varying production aims at the abattoir. Dataset 1 and 2 used a registration form to register spots developed by NOFIMA in a former FHF project (called the FHF registration form) while dataset 3 used a yes/no-method. The FHF registration form is more detailed and this may affect the level of training and focus of the personnel that perform the registrations and finally generate data that are more reliable.

It is necessary to clarify whether the prevalence of spots that is registered on filets are representative for the source population of salmon at one given production site or one producer. This is important to elucidate because production data on the risk factors used in epidemiological studies are collected from the source population. Possible differences in the prevalence of spots between the selected population that is fileted and the source population may affect the results in studies investigating risk factors that influence the prevalence of melanised spots.

The data on the prevalence of spots and risk factors (production data and diagnosis) in this project is collected at site level. Due to a large variation between cages in the production parameters that are registered during the seawater phase, the statistical power of the results from epidemiological studies using data at site level will therefore be reduced. Furthermore, the formation of melanised spots in salmon filets are most likely multifactorial and hence implies the necessity of having data with high resolution (i.e. cage level) to secure reliable results and increase the probability of detecting key factors for developing melanised spots. Future studies should therefore include data at cage level that includes a possibility to track the fish from the cage it is put to sea in and to the cage the same group of fish is slaughtered from. In this way, minor incidences or factors can be identified and possibly explain differences in prevalence between cages, sea sites and between fish generations.

The multivariable analysis that was performed in this project identified different risk factors for the presence of melanised spots between the included datasets. In dataset 1, PD- and HSMB-status, season for seawater transfer and length of time at sea was negative and significantly associated with the prevalence of spots. Furthermore, the average weight at seawater transfer was positively and significantly associated with the prevalence of spots in dataset 1. In dataset 2, mortality due to handling and share of systemic support feed was negatively and significantly associated with the prevalence of spots. The prevalence of spots was positively and significantly associated with length of time at sea in dataset 2. In dataset 3 was

the prevalence of spots negatively and significantly associated with CMS-status and age at the time of seawater transfer (1 year smolt). Longitude and age at the time of seawater transfer (1.5 year smolt) was positively and significantly associated with the prevalence of spots in dataset 3.

These results shows that the presence of melanised spots in salmon filets are multifactorial and the risk factors for spots vary between different datasets. A general trend in all three datasets is that the prevalence of spots is influenced by factors linked to the immune response of the salmon, either directly such as virus infection or indirectly such as usage of functional feed. The positive effect observed by the increased use of systemic functional feed in dataset 2 is based on low-resolution data and needs to be confirmed in detailed studies. The results in this report reveal also a trend towards an increase in prevalence of spots in fish groups that have two diagnoses of virus diseases or have a diagnosis of virus disease in addition to mortality due to handling. These results are supported by the same findings in another study and should be studied in a more detailed epidemiological study.

The results in this project give important information about how melanised spots should be registered and handled and how the use of production data needs to be improved in epidemiological studies seeking to identify risk factors for melanised spots. This will improve the possibilities for detecting risk factors for melanised spots in salmon production and thus enhance the possibility for initiating effective preventive measures.

3. Bakgrunn

Melaninflekker i filéten er det største kvalitetsproblemet for norsk oppdrettslaks [1, 2]. Flekkene forekommer i varierende grad i alle populasjoner av slakteklar fisk. Prevalensen av filéter med melaninflekker har vært økende siden de første systematiske registreringene i 2003 som viste en prevalens på 7% [2]. I 2015 ble flekker av en slik grad at det har kvalitetsforringende betydning påvist i omlag 20% av filétene ved slakting, og på enkelte slakt er andelen oppe i 25- 30%. Utvikling og forekomst av melaninflekker synes å ha en kompleks årsakssammenheng, der mange forskjellige faktorer kan spille en rolle.

Allerede da furunkulosevaksiner til injeksjon, som inneholdt aluminiumsadjuvans, ble tatt i bruk på slutten av 1980-tallet, ble pigmentflekker i bukhinnen og på overflaten av bukorganer på vaksinert fisk beskrevet som en sannsynlig bivirkning av vaksinasjon [3]. Da vaksiner med oljebasert adjuvans ble tatt i bruk, økte problemene med slike bivirkninger [4]. Fra midten av 90-tallet økte forekomsten av pigmentflekker i filétene hos slaktefisk. Nærmere studier av patologien ved sammenvoksinger og pigmentflekker, sammen med epidemiologiske studier, har vist at pigmentflekkene i filét består av melanin, og at pigmentering i muskulaturen til laksen ikke er en følge av vaksinasjon med adjuvansholdige vaksiner [5]. Hos fisk produseres melanin av en type immunceller som heter melanomakrofager, og ansamlinger av disse cellene i muskelvev danner melaninflekkene en ser hos oppdrettet atlantisk laks [6].

Mørkøre og medarbeidere etablerte et scoringssystem for melanin i filét, og gjennomført en større kartlegging av forekomst i tilslutning til slakting av laks. Dette prosjektet pekte også på mulige faktorer som kan ha betydning for utviklingen av melanin, for eksempel førsammensetning [7].

I en studie publisert fra NMBU - Veterinærhøgskolen av Bjørgen og medarbeidere i 2015, ble det vist at Piscint orthoreovirus (PRV) kan påvises i muskulatur både i pigmentflekker og i røde flekker, som antas å være forstadier til de mørke, svartfargede flekkene [8]. Funnene tyder på at viruset kan være en viktig faktor i utviklingen av melaninflekker. PRV er årsaken til den viktige laksesjukdommen hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) [9]. HSMB ble beskrevet av forskere ved Veterinærinstituttet på slutten av 1990-tallet [10], og viruset ble beskrevet i 2010 [11].

Andre studier antyder også mulige sammenhenger mellom andre virusinfeksjoner og melanin/pigment, som kardiomyopatisyndrom (CMS) [2] og pankreassjuka (PD) [2, 12]. Dette er viktige virussykdommer i norsk lakseoppdrett, som gir store produksjonstap.

4. Målsetting

Hovedmålet med dette studiet var å vurdere kvaliteten til tre datasett bestående av melaninregistreringer, og se om disse datasettene kunne brukes til å identifisere mulige risikofaktorer for utviklingen av melaninflekker i skjelettmuskel i norsk oppdrettet atlantisk laks. Risikofaktorene som ble inkludert i datasettene var diagnoser av virussykdommene HSMB, PD og CMS hentet fra Veterinærinstituttet sitt journalsystem, samt produksjonsdata fra de tre datasettene.

Prosjektet skulle også inkludere data om tilstedeværelse av PRV, salmonid alphavirus (SAV, som gir PD) og piscint myocardittvirus (PMCV, som gir CMS) i populasjonene, og vurdere om denne informasjonen bidrar til å avklare betydningen av virusinfeksjoner på prevalensen av melaninflekker.

Ut fra arbeidet med datasettene og resultatene fra analysene skulle prosjektet komme med forslag til endringer som kan redusere forekomsten av melaninflekker i filét, men også å gi råd om hvordan registrering av melaninflekker kan forbedres for å øke kvaliteten på dataene som hentes inn.

Det siste delmålet i prosjektet var å komme med et forslag til et oppsett for en longitudinell studie (livsløpsstudie) basert på identifiserte risikofaktorer i de aktuelle datasettene, som kunne bidra til å klargjøre årsaksforholdene for melaninavleiring i skjelettmuskulatur i større detalj.

5. Materiale og metoder

Materialet som ble analysert i dette prosjektet besto av tre forskjellige datasett, to datasett samlet inn av to forskjellige produsenter av laks, og ett datasett som var et uttrekk fra en database samlet inn i et tidligere FHF-prosjekt (FHF#900824) av NOFIMA.

5.1. Datasett 1

Dataene i datasett 1 var registrert på fisk som var slaktet i tidsrommet januar 2013 til desember 2015 og levert fra 14 lokaliteter i Møre og Romsdal. Datasettet besto av to versjoner, ett med individregistreringer av scoringer av melaninflekker og ett datasett med prevalensen av melaninflekker i hvert enkelt slakteparti utarbeidet fra individregistreringene.

Datasettet med individregistreringer (N=69260 fisk) inneholdt plassering og alvorlighetsgrad (scoret fra 0 til 8 på en log₂-skala) på et tilfeldig utvalg av 50 - 120 filéter per slakteparti, bedømt etter FHF-malen utviklet av NOFIMA i FHF-prosjektet 900265.

Datasettet med prevalensdataene besto av 673 registreringer. En registrering er prevalensen av melaninflekker på filéter fra ett slakteparti levert fra en merd på en lokalitet. Det kan derfor være flere slaktepartier fra samme merd.

Produksjonsrelaterte variabler som ble inkludert i datasettet var lokalitetsnummer, generasjon, slaktedato og -måned, produksjonstype (økologisk og konvensjonell), lokalitetsnavn, lengde- og breddegrad, snittvekt ved utsett på lokalitetsnivå (hentet fra innrapporterte tall til Fiskeridirektoratet), sesong for utsett (høst/vår), samt antall måneder fra PD-/HMSB-/CMS-diagnose til slakt (Tabell 4). Informasjon om PD-, HMSB-, og CMS-diagnoser ble hentet fra Veterinærinstituttet sitt journalsystem og ble inkludert i datasettet i tre kategorier, se kapittel 5.5 for ytterligere detaljer.

5.2. Datasett 2

Datasettet besto av 2786 registreringer av melaninprevalens fra fisk slaktet i tidsrommet 2010 til 2016 og levert fra 41 lokaliteter i Rogaland og Hordaland. En registrering er prevalensen av melaninflekker på filéter fra ett slakteparti. Det kan derfor være flere slaktepartier fra samme merd. Fisken som ble levert til filétering var av kvalitetsklassen «superior» og i vekt-kategorier mellom 3 og 7 kg (rund fisk).

Hver registrering besto av melaninscoring av i størrelsesorden 100 filéter (+/- 10) (N=2752), men også fra partier med 50-89 filéter (N=29). Registreringer var gjort på 120 og 300 filéter for fire slaktepartier. Det ble scoret melanin på 50% høyre filéter og 50% venstre filéter men alle filéteene var fra ulike individer. Melaninscoringen ble gjort etter FHF-malen utviklet av NOFIMA i FHF-prosjektet 900265.

De produksjonsrelaterte variablene som ble inkludert i datasettet er vist i Tabell 4 og var lokalitetsnummer, slaktedato, generasjon, akkumulert prosentvis dødelighet, håndteringsdødelighet, snittvekt ved utsett i sjø på lokalitetsnivå (hentet fra innrapporterte tall til Fiskeridirektoratet), sesong for utsett (høst/vår), lengde- og breddegrad, antall måneder fra PD-/HMSB-/CMS-diagnose til slakt, antall måneder fra utsett til slakt, SGR (specific growth rate), bFCR (biological feed conversion rate) og eFCR (economic feed conversion rate). De tre siste variablene ble inkludert i analysen som indikatorer på generell ytelse til utsettene, og som et mål på effekten av virusykdommene de ulike utsettene har opplevd.

Informasjon om PD-, HMSB-, og CMS-diagnoser ble hentet fra Veterinærinstituttet sitt journalsystem og ble inkludert i datasettet i tre kategorier, se kapittel 5.5 for ytterligere detaljer.

Data om fôrforbruk ble også inkludert i datasett 2. Fôrforbruket ble delt inn i standard-, helse- og medisinfôr, og fôrforbruket ble beregnet som andel utfôret i forhold til det som ble totalt utfôret på hvert enkelt utsett på lokaliteten. Helsefôr inkluderer fôr som skal ha støttende funksjoner på det systemiske

funksjoner (bl.a. immunsystemet og andre fysiologiske funksjoner hos laksen) og slimhinnene til fisken i utsatte faser av produksjonen.

5.3. Datasett 3

Datasettet besto av 1449 registreringer av melaninprevalens fra fisk slaktet i tidsrommet januar 2012 til september 2014 og levert fra 78 lokaliteter fra Agder til Nord-Trøndelag. Hver registrering består av et tilfeldig utvalg av 50 filéter fra de nedklassifiserte filéene. Melaninflekker som nedklassifiseringsårsak ble registrert binært (tilstedeværelse eller ikke av flekker i filéten), og prevalensen ble registrert i de 50 filéene som ble valgt ut. Denne prevalensen ble brukt til å beregne totalt antall nedklassifiserte filéter med flekker. Dette antallet ble så brukt til å beregne prevalensen av flekker fra det totale antallet filéter i hele slaktepartiet.

Variabler som ble inkludert i datasettet er vist i Tabell 4, og var lokalitetsnummer (sjø), slaktedato, generasjon, fiskegruppe, akkumulert % dødelighet, dødelighetsårsak registrert som PD, HSMB eller CMS på utsett, håndteringsdødelighet, sesong for utsett (høst/vår), alder ved utsett (0-, 1-, og 1.5-åring), lengde- og breddegrad, smoltanlegg som leverte fisken, utført behandling mot lakselus (ja/nei) og antall badebehandlinger mot lakselus per utsett på lokaliteten.

Dataene om PD-, HSMB-, og CMS-dødelighet ble omformet til tre kategorier i datasettet på samme måte som for diagnosene hentet fra Veterinærinstituttet i datasett 1 og 2, se kapittel 5.5 for detaljer om inndelingen av kategoriene.

5.4. PatoGen - screeningdata

Screeningdata fra PatoGen ble undersøkt om det kunne brukes i analysen av melanindataene. En generell utfordring med screening data for virus i retrospektive studier, er at prøveuttakene ofte er fra tilfeldige tidspunkt etter utsett og ikke jevnlig frem mot første påvisning av viruset. Det er derfor problematisk å bruke disse dataene til å analysere effekten på prevalensen av melaninflekker ved slakt.

I fremtidige prosjekter vil det derfor være nødvendig å designe feltstudier med tanke på å øke verdien av screeningdata. Dette vil være nødvendig for å kunne si noe om effekten av tilstedeværelse og mengde av virus har på prevalensen av melaninflekker i atlantisk laks.

5.5. Veterinærinstituttet - sykdomsdiagnoser

Diagnoser av sykdommene HSMB, PD og CMS ble hentet fra journalsystemet til Veterinærinstituttet og inkludert i datasett 1 og 2. Diagnosene som var registrert på utsettene ble omformet til 3 kategorier i datasettene:

1. Diagnose-status

- Utsettene fikk status som PD-/HSMB-/CMS-positive hvis PD, HSMB eller CMS har blitt diagnostisert på lokaliteten utsettet sto på
- Hver virusdiagnose ble registrert i egne kolonner i datasettet
- Siden et utsett kan ha flere ulike virussykdommer i løpet av et utsett, kan det derfor ha status som både PD-positiv i en kolonne og HSMB-positiv i en annen kolonne.
- Disse variablene sier noe om betydningen av en PD-, HSMB- eller CMS-diagnose i løpet av tiden i sjø på prevalensen av melaninflekker i et utsett, uavhengig om det samme utsett har fått andre virusdiagnoser.

2. Antall forskjellige virusdiagnoser (PD, HSMB, CMS) i løpet av et utsett

- Ingen virussykdommer registrert: Utsett som ikke har fått diagnostisert noen av de tre nevnte virussykdommene i løpet av tiden i sjø
- 1. diagnose registrert: Utsett som bare har fått diagnostisert én av de nevnte virussykdommene i løpet av utsett

- 2. diagnoser registrert: Utsett som har fått diagnostisert to av de nevnte virussykdommene i løpet av utsett
 - 3. diagnoser registrert: Utsett som har fått diagnostisert alle tre virussykdommer i løpet av utsett
3. Utsett med spesifisert virusdiagnose som er registrert i løpet av utsett inkludert kombinasjoner av diagnoser
- PD pos: Utsett som kun har fått diagnostisert PD i løpet av utsett
 - HSMB pos: Utsett som kun har fått diagnostisert HSMB i løpet av utsett
 - CMS pos: Utsett som kun har fått diagnostisert CMS i løpet av utsett
 - PD.CMS pos: Utsett som har fått diagnostisert både PD og CMS i løpet av utsett
 - PD.HSMB pos: Utsett som har fått diagnostisert både PD og HSMB i løpet av utsett
 - HSMB.CMS pos: Utsett som har fått diagnostisert både HSMB og CMS i løpet av utsett
 - PD.HSMB.CMS pos: Utsett som har fått diagnostisert PD, HSMB og CMS i løpet av utsett

Antall måneder fra første diagnose ble registrert på utsett fram til slakt inkludert som en egen kontinuerlig variabel for å undersøke om tid mellom diagnose og slakt påvirket prevalensen av melaninflekker.

5.6. Databehandling

Databehandling, alle statistiske analyser og grafiske fremstilling av dataene ble gjort i R, versjon 3.3.3 (2017.03.06, «Another Canoe», The R Foundation for Statistical Computing). Noe manuell redigering av rådata ble gjort i MS Excel før importering til R.

5.7. Statistisk metode

Forskjeller i melaninprevalens mellom grupper ble testet med en Student t-test. Korrelasjon mellom melaninprevalens og risikofaktorer ble undersøkt ved å gjøre en Spearman's rank korrelasjonsanalyse av binære og kategoriske variabler, og en Pearson korrelasjons analyse ble gjort med kontinuerlige numeriske variabler. Signifikansnivå ble satt til en p-verdi < 0.05.

Det ble gjennomført en regresjonsanalyse med melaninprevalens (alle tre datasettene) eller melaninscore (individdataene fra datasett 1) som utfallsvariabel og risikofaktorene listet i Tabell 4 som forklaringsvariabler. Hvert datasett ble strukturert i forkant av analysen, slik at fiskegrupper som hadde blitt flyttet mellom sjølokaliteter (kategorisert som «Flyttet til lok» i datasettene) ble ekskludert fra datasettet. Disse gruppene ble ekskludert fordi informasjonen om produksjonsdata ikke var fullstendig fra utsett til slakt i disse gruppene. Regresjonsanalysen som ble utført, var en lineær mixed effekt regresjonsanalyse (R-pakke: lme4) med randomeffekt på generasjon. Random effekt på generasjon ble inkludert i regresjonsanalysen for å ta høyde for variasjonen i prevalens av melaninflekker mellom generasjoner.

Forklaringsvariabler som ble inkludert i den ferdige modellen var alle signifikante ($p < 0.05$), og at R^2 -verdien ble høyere når forklaringsvariabelen var med i modellen. R^2 -verdien sier noe om hvor mye av variasjonen av prevalensen av flekker som blir forklart av forklaringsvariablene; jo høyere R^2 -verdi, jo bedre regresjonsmodell. Både Akaike's information criteria (AIC) og Bayesian information criterion (BIC) ble brukt til å evaluere hver modell og til å sammenligne denne med 0-modellen; jo lavere AIC- og BIC-verdier, jo bedre regresjonsmodell. 0-modellen er en modell uten forklaringsvariabler med random effekt på generasjon. Sammenligning med 0-modellen ble i tillegg gjort ved å utføre en variansanalyse (ANOVA).

Regresjonsanalysen av dataene ble utført i to runder. I første runde ble en univariat analyse utført. I denne analysen ble kun en og en forklaringsvariabel inkludert i analysen. Formålet med denne analysen var å se hvor mye hver enkelt variabel forklarte melaninprevalensen. I den andre runden ble det utført en multivariabel analyse. I denne analysen ble alle forklaringsvariablene modellert for å gi best mulig forklaring av melaninprevalensen i de forskjellige datasettene.

Median brukes når prevalensen av melaninflekker presenteres

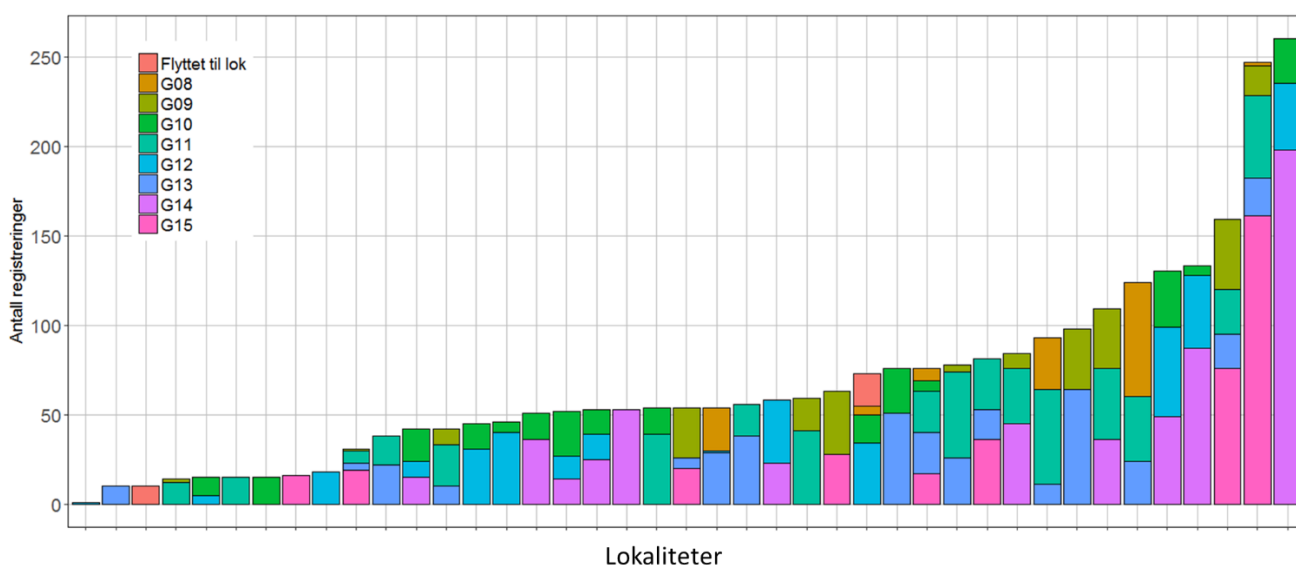
I denne rapporten brukes median når prevalensen av melaninflekker skal presenteres. Median av melaninprevalensen er den prevalensen som er midten i et sortert datasett hvor verdiene er sortert i stigende rekkefølge. Dette gjør at medianen viser en mer representativ prevalens for hele gruppen, sammenlignet med gjennomsnittet av prevalensen som blir påvirket av veldig høye verdier (uteliggere).

6. Resultater

I dette kapittelet av rapporten blir resultatene presentert, og betydningen av disse blir videre diskutert i diskusjon-delen av rapporten (kapittel 7). Resultatene fra regresjonsanalysene er hovedsakelig omtalt separat i kapittel 6.6.

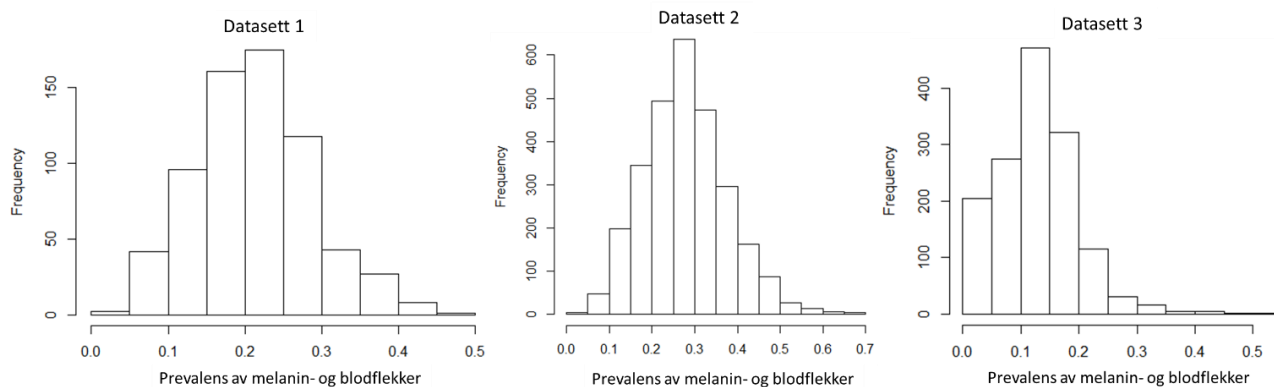
Bidraget av antall registreringer (slaktepartier hvor melaninregistrering har blitt utført) varierer mellom lokaliteter og generasjoner som vist i Figur 1. Denne figuren viser også at bidraget fra noen generasjoner er større enn andre. Dette viser en variasjon i datasettene på lokalitets- og generasjons-nivå som vil kunne påvirke resultatene når statistiske analyser gjennomføres. Dette er viktig informasjon som må tas med når en tolker resultatene fra analysene.

I arbeidet med datasettene i dette prosjektet kunne en ha ekskludert anlegg som har bidratt med under 50 eller over 150 registreringer for å gjøre datasettet mer homogent. Dette ble ikke gjort i denne analysen da vi ønsket å inkludere alle anlegg i datasettet.



Figur 1. Antall registreringer (melaninprevalens bestående av 50-100 filéter fra et slaktepartier) som de ulike lokalitetene og fiskegenerasjonene har bidratt med i datasett 2. G08: generasjon 2008 (smolt som ble sjøsatt i 2008). «Flyttet til lok»: fisk med snittvekt over 1.0 kg som ble flyttet fra en sjølokalitet til en annen, og det var derfor ingen informasjon fra smolt-utsettet på denne fisken. Y-aksen viser antall registreringer fra hver lokalitet i datasettet.

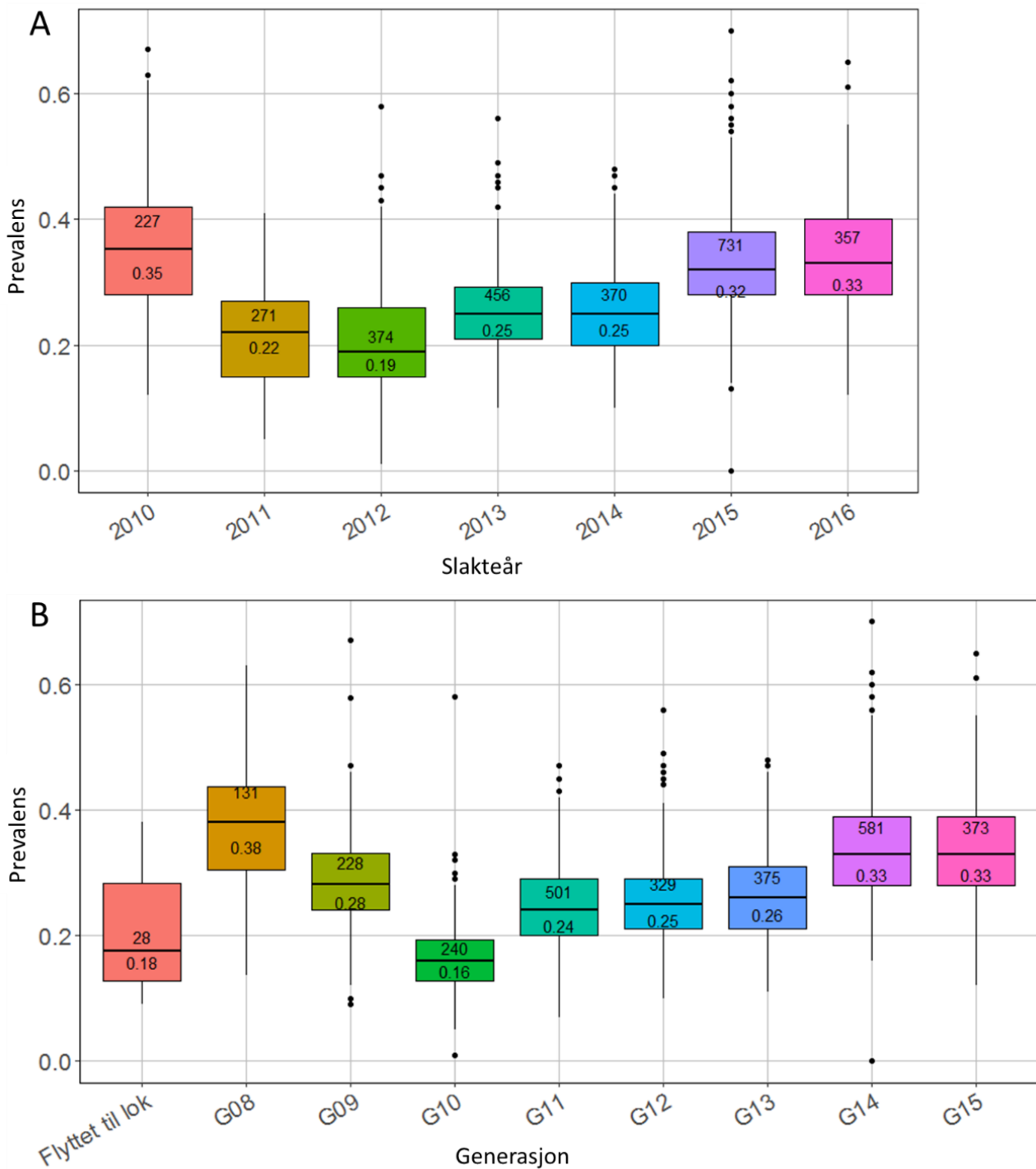
Frekvensen av melaninprevalens i slaktepartiene i datasettene er vist i Figur 2. Dette viser at datasett 1 og 2 har tilnærmet normalfordelt prevalens av melaninflekker. Dette styrker de statistiske analysene av risikofaktorer for utvikling av melaninflekker i disse datasettene. Datasett 3 viser en venstreforskyvning av prevalensen av melaninflekker. Denne forskyvningen av melaninprevalensen i datasett 3 kan påvirke resultatene fra analysene. Forskjellene mellom datasett 1 og 2 og datasett 3, som er vist i Figur 2, kan reflektere forskjellig registreringsrutiner, og gjør at en ikke nødvendigvis kan ekstrapolere resultater/konklusjoner mellom disse datasettene (se kapittel 7.1 for videre diskusjon).



Figur 2. Frekvensen av prevalensen av flekker i filéter i de forskjellige datasettene. Prevalensen (x-aksen) er presentert som andel og må multipliseres med 100 for å få verdiene som %.

6.1. Prevalensen av melaninflekker per år og generasjon

Prevalensen av melaninflekker i datasett 2 er vist i Figur 3, og er fordelt på slakteår (Figur 3A) og generasjon (Figur 3B). Streken i hver boks indikerer median prevalens, og tallet over og under median-streken viser hhv. antallet registreringer og median prevalens i hver undergruppe. I datasett 2 gikk melaninprevalensen i slaktepartier fra 2010 til 2012 ned fra 35% til 19% mens prevalensen økte gradvis til 33% i slaktepartier som ble slaktet i 2016 (Figur 3A). Når prevalensen av melaninflekker fremstilles på generasjonsnivå, blir bildet mye mer nyansert (Figur 3B). Her er fisk som har blitt flyttet mellom sjølokaliteter blitt samlet i en egen gruppe («Flyttet til lok»), og denne gruppen har en melaninprevalens på 18% i datasett 2. Prevalensen av flekker synker markant fra G08 til G10, hvor G10 har den laveste melaninprevalensen i dette datasettet. Den samme trenden i melaninprevalens for G10 ble også funnet i et studie gjort av Jimenez og medarbeidere i 2015 [12]. Disse forskerne analyserte risikofaktorer for melaninflekker i et datasett hentet fra lokaliteter i Sør-Trøndelag og Møre og Romsdal [12]. Melaninprevalensen i datasett 2 øker så gradvis fra G10 til G14 og G15, som begge har en median prevalens på 33% (Figur 3B).



Figur 3. Prevalensen av flekker fordelt på slakteår (A) og generasjon (B). Streken i boksen indikerer medianen, og tallet over og under medianstreken er antallet registreringer og medianen av prevalensen for hver subgruppe. Den nedre og øvre kanten av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene respektivt, og den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt inter-quartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene.

Prevalensen av melaninflekker i alle datasettene i prosjektet er oppsummert i Tabell 1, som viser median prevalens av flekker fordelt på generasjon i hvert datasett. I datasett 1 varierte median melaninprevalens fra 19% i G11 til høyest nivå på 22% i G12 og ned til 20% i G14. Gruppen «Flyttet til lok» i datasett 1 hadde en median prevalens på 24%. I datasett 3 sank median melaninprevalens noe fra 15% i G11 til 11% i G13 (Tabell 1).

Tabell 1. Median prevalens av melaninflekker fordelt på generasjon i hvert datasett. Antall slaktepartier i hver undergruppe er gitt bak prevalensen i parentes. Gruppen «Flyttet til lok» er fisk som har blitt flyttet mellom sjølokaliteter i løpet av sjøperioden.

	Datase tt 1	Datase tt 2	Datase tt 3
G08		38 % (N=131)	
G09		28 % (N=228)	
G10		16 % (N=240)	
G11	19 % (N=51)	24 % (N=501)	15 % (N=422)
G12	22 % (N=181)	25 % (N=329)	12 % (N=838)
G13	17 % (N=91)	26 % (N=375)	11 % (N=186)
G14	20 % (N=86)	33 % (N=581)	
G15		33 % (N=373)	
Flyttet til lok	24 % (N=261)	18 % (N=28)	

6.2. Effekt av sesong for utsett i sjø

Det ble ikke funnet noen forskjeller i melaninprevalens mellom fiskegrupper satt i sjø på våren eller høsten i datasett 1 og 2 (Tabell 2). Samtidig viste multivariabel regresjonsanalysen av datasett 1 at utsett hadde en signifikant assosiasjon til melaninprevalensen (se Tabell 6 og kapittel 7.6 for mer detaljer). I datasett 3 ble det funnet en signifikant lavere prevalens i vår-utsettene sammenlignet med høst-utsettene (t-test, $p < 0.001$, 95% CI: -0.042, -0.027). Det var også en signifikant positiv korrelasjon (Pearson, $r = 0.24$, $p < 0.0001$, $N = 1446$) mellom melaninprevalens og sesong for utsett i datasett 3. Når vi derimot undersøkte effekten av sesong for utsett i en univariat regresjonsanalyse, fant vi ingen effekt på melaninprevalensen ($R^2 = 0.07$, $p < 0.05$).

Disse eksemplene viser at en potensiell risikofaktor kan ha effekt på prevalensen av flekker i et datasett men ingen effekt i et annet. Videre er det viktig å merke seg at selv om én type statistisk test viser en signifikant forskjell mellom to undergrupper, må dette underbygges av andre statistiske metoder, som regresjonsanalyse i dette tilfellet. Dette ble vist i datasett 3 hvor en forskjell mellom sesong for utsett ble påvist i t-testen, ble avkreftet av univariat regresjonsanalysen. Videre vil en multivariabel regresjonsanalyse korrigere for effekten av andre forklaringsvariabler, noe om er viktig å ta med når en vurderer effekten av enkeltvariabler på prevalensen av melaninflekker.

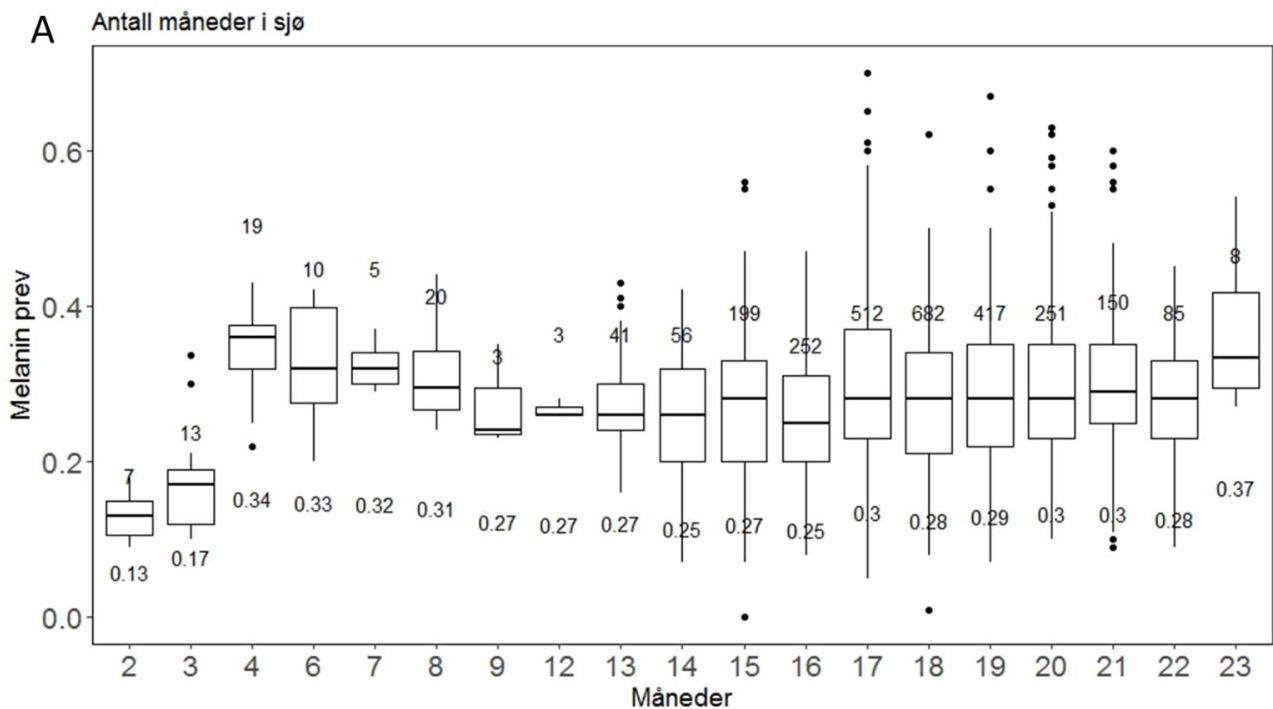
Tabell 2. Median prevalens av melaninflekker fordelt på utsett-tidspunkt. Antall slaktepartier er gitt bak prevalensen i parentes.

	Datase tt 1	Datase tt 2	Datase tt 3
Vår-utsett	20 % (N=222)	29 % (N=1644)	11 % (N=600)
Høst-utsett	19 % (N=187)	26 % (N=1062)	14 % (N=846)

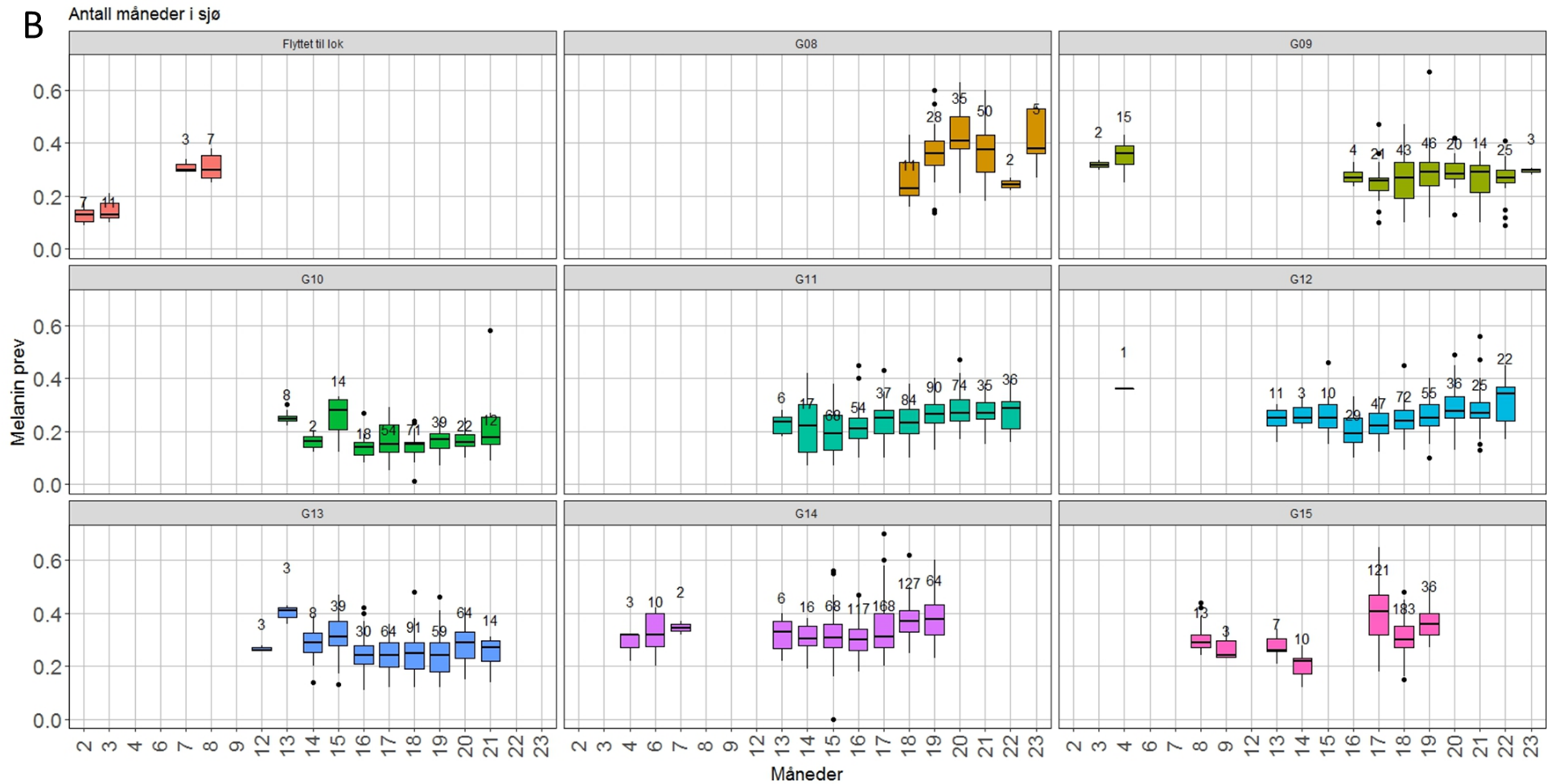
6.3. Effekt av tid i sjø

I Figur 4 er prevalensen av melaninflekker i datasett 2 fordelt på antall måneder fisken har stått i sjø. Hele datasettet er vist samlet i Figur 4A og i Figur 4B er dataene fordelt per generasjon. Når en kun ser på melaninprevalensen fra 13 - 22 måneder (måneder med færre enn 40 registreringer er selektert bort) i Figur

4A, er prevalensen relativt stabil på 25 - 30%. Fordelt på generasjon er det liten variasjon i hver generasjon, men noe forskjeller mellom generasjoner. Slaktepartiene som har stått 2 - 4 måneder i sjø, er fra fisk som har blitt flyttet mellom sjølokaliteter («Flyttet til lok») (Figur 4B), og den reelle tiden i sjø er derfor lengre i sjø enn det figuren viser. Disse registreringene er likevel relevante å ta med, da dette kan være fisk som er spesielt selektert fra den opprinnelige lokaliteten, og derfor kan bidra til å forklare hvorfor noen av disse gruppene har lav melaninprevalens i dette datasettet.



Figur 4A. Prevalensen av flekker fordelt på antall måneder i sjø hvor alle registreringene er samlet. Streken i boksen indikerer medianen, nedre og øvre kant av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene. Den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt inter-quartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene. Tallet over medianstreken er antallet observasjoner som er inkludert i hver subgruppe. Tallet under medianstreken er medianen for subgruppen.



Figur 4B. Prevalensen av flekker fordelt på antall måneder i sjø fordelt på generasjon. Kun antall registreringer er vist over boksen i denne figuren.

6.4. Effekt av dødelighet, virussykdom og håndtering

Flere studier har vist en mulig sammenheng mellom melaninflekker og virussykdommene PD, HSMB eller CMS i oppdrettet atlantisk laks [2, 12]. Det ble nylig funnet at PRV er assosiert med melaninflekker i laksefilet [8]. Dette styrker hypotesen om at en virusinfeksjon kan være en nødvendig og/eller utløsende faktor for dannelsen av melaninflekker i atlantisk laks. Det er flere pågående prosjekter som arbeider med å studere de molekylære mekanismene for dannelsen av melaninflekker.

Dødelighet

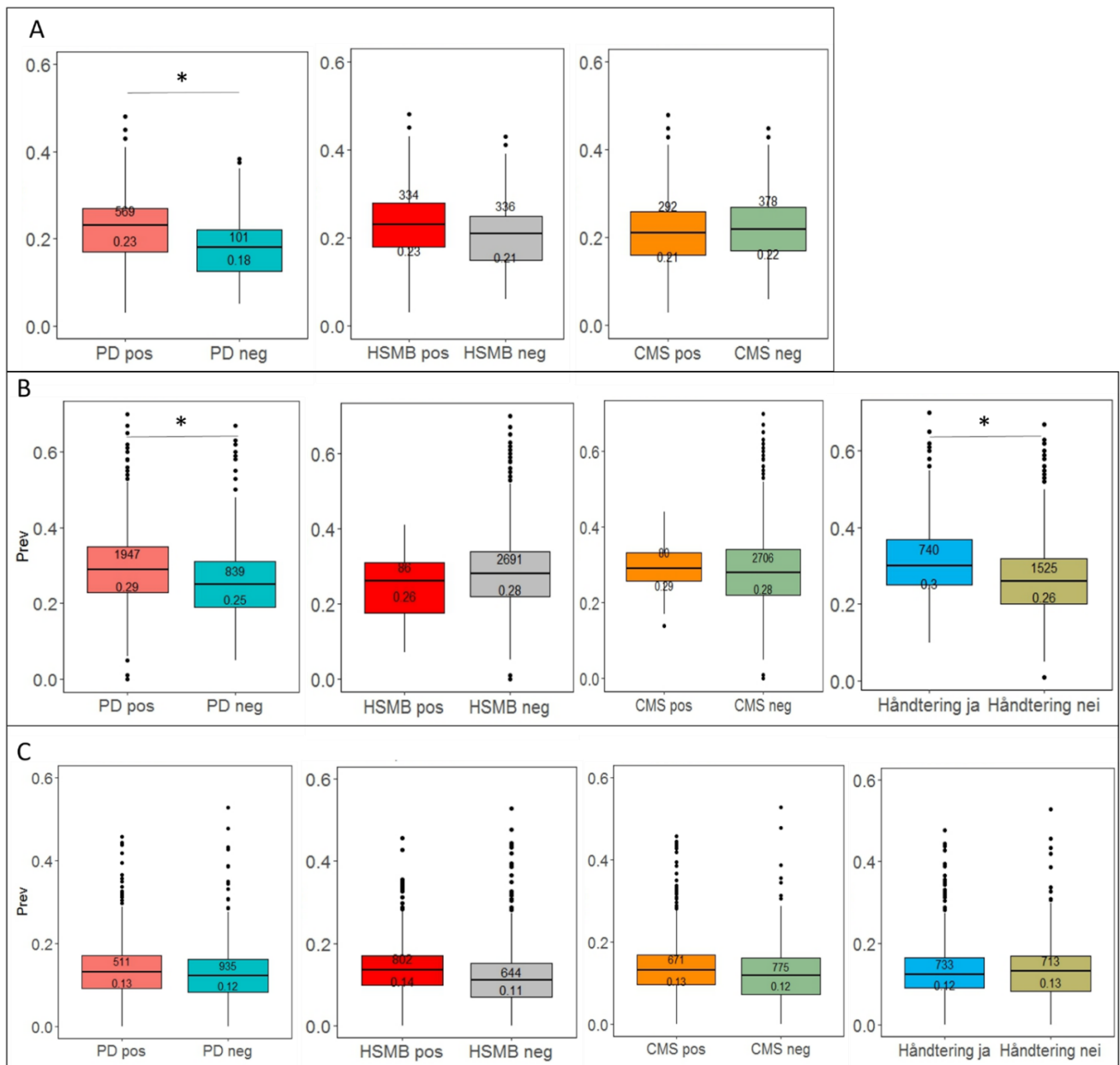
Dødelighet vil reflektere alvorlighetsgrad til sykdommer som fisken blir utsatt for i løpet av sjøperioden. Dette kan også gjenspeile dødelighet som følge av miljøstress, ved for eksempel håndtering. Det er derfor naturlig å undersøke om det er en sammenheng mellom dødelighet og melaninprevalens. Det var ingen korrelasjon mellom prosent akkumulert dødelighet på lokalitetsnivå ved slakt og melaninprevalens i datasett 1 og 3 ($r < 0.05$, $p > 0.5$), men en svak positiv korrelasjon ble funnet i datasett 2 ($r = 0.17$, $p < 0.01$).

Virussykdom

Diagnoser av virussykdommene PD, HSMB og CMS ble hentet fra journalsystemet til Veterinærinstituttet i datasett 1 og 2, og fra dødelighetsregistreringer i datasett 3. Diagnosene ble koblet til utsettene på lokalitetsnivå og ble registrert som tre forskjellige kategorier i datasettene (se kapittel 5.5 for detaljer om kategoriseringen).

I Figur 5 er prevalensen av melaninflekker fordelt på utsett som har fått status positiv eller negativ for diagnosene PD, HSMB eller CMS. Datasett 1, 2 og 3 er fremstilt i hhv. Figur 5A, B og C. Figur 5 gir derfor en indikasjon på hvordan en PD-, HSMB- eller CMS-diagnose i løpet av sjøperioden påvirker prevalensen av melaninflekker i et utsett. Siden diagnosene og melaninprevalensen er gitt på lokalitetsnivå, mister en variasjonen mellom merder i et anlegg, og variasjonen mellom generasjoner i melaninprevalens. Dette vil øke usikkerheten til tolkningen av disse resultatene. Videre er plottene i Figur 5C ikke direkte sammenlignbare med Figur 5A og 5B på grunn av ulikt registreringssystem for melaninflekker og diagnoseregistrering i datasett 3 sammenlignet med datasett 1 og 2.

I Figur 5B og C er også prevalensen av melaninflekker fordelt på om utsettene har registrert håndteringsdødelighet i løpet av sjøperioden. Denne informasjonen var ikke tilgjengelig for datasett 1, og derfor ikke med her.



Figur 5. Prevalensen av flekker fordelt på sykdomsdiagnose i datasett 1 (A), datasett 2 (B) og datasett 3 (C). PD: Pankreassykdom, HSMB: Hjerne- og skjelettmuskelbetennelse og CMS: Kardiomyopatisyndrom. «Pos» og «neg» indikerer at utsettet på den enkelte lokaliteten har fått en hhv positiv og negativ diagnose registrert. «Håndtering ja» og «Håndtering nei» indikerer slaktepartier hvor håndteringsdødelighet har blitt registrert i løpet av utsettet. Streken i boksen indikerer medianen, nedre og øvre kant av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene. Den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt interquartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene. Tallet over medianstreken er antallet observasjoner som er inkludert i hver subgruppe. Tallet under medianstreken er medianen for subgruppen. Statistisk forskjell ble testet med en Student t-test og er indikert med * og en p-verdi under 0.05.

I datasett 2 er det svært få slaktepartier som kommer fra lokaliteter som har fått HSMB eller CMS diagnostisert i løpet av sjøfasen (se Tabell 3). Dette er viktig å merke seg når en skal vurdere effekt av en diagnose av de ulike virussykdommene. Denne skjevheten i påvisninger mellom virussykdommene gjør det derfor vanskelig å konkludere på hvilke virussykdom som har størst effekt på melaninprevalensen med denne type sykdomskategorisering.

Tabell 3. Antall slaktepartier fordelt på virusdiagnose i de ulike datasettene

	Datasekk 1	Datasekk 2	Datasekk 3
PD positive	569	1947	511
PD negative	101	839	935
HSMB positive	334	86	802
HSMB negative	336	2691	644
CMS positive	292	80	671
CMS negative	378	2706	775

Effekt av PD-status (positiv eller negativ diagnose i løpet av utsett)

Slaktegrupper som kommer fra utsett som har hatt PD, viste en høyere prevalens av melaninflekker i datasett 1 (Figur 5A) og 2 (Figur 5B) sammenlignet med utsettene som ikke har hatt PD. Det ble også påvist korrelasjon på 26% og 34% mellom melaninprevalens og PD-status i hhv. datasett 1 og 2 ($p < 0.05$). Denne forskjellen mellom PD-status var signifikant (Student t-test) i begge datasettene, men i regresjonsanalysen har PD-status liten forklaringsstyrke i datasett 1 ($R^2 = 0.06$), mens i datasett 2 forbedrer PD-status forklaringen av variasjonen av melaninprevalensen (se kapittel 6.6 for mer detaljer). Dette tyder på at PD diagnose ikke har en ensidig effekt på melaninprevalensen i disse datasettene.

Det er viktig å merke seg at datasett 1 er hentet fra det endemiske SAV2 området (Møre og Romsdal) og datasett 2 er hentet fra endemisk SAV3 område. Infeksjon med SAV2 og SAV3 gir forskjellig alvorlighetsgrad, hvor SAV3 gir høyest dødelighet både i smitteforsøk [13] og i felt [14]. Derfor kan ikke PD-resultatene fra datasett 1 og 2 sammenlignes direkte før kontrollerte studier har vist at en eventuell sammenheng mellom SAV-infeksjon og melaninflekker er uavhengig av SAV-subtype. Datasett 3 består av anlegg fra Rogaland til Nord-Trøndelag, og spenner derfor over både SAV2 og SAV3 områder, og her vises ingen forskjell i melaninprevalens mellom PD positive og negative utsett (Figur 5C).

Når en fordeler prevalensen av melaninflekker på PD status og generasjon i datasett 1, ser en at PD negative utsett tenderer mot lavere melaninprevalens i noen generasjoner, mens i andre generasjoner er det ingen forskjeller i prevalens mellom PD positive og negative utsett (Figur S1A i Vedlegg). Disse resultatene er i tillegg inkonklusive på grunn av et lavt antall PD negative utsett per generasjon i dette datasettet. I datasett 2 ser en at PD positive utsett i G08 og G09 har lavere melaninprevalens, G10 til G13 har ingen forskjell i prevalens mellom PD-status på utsettene, mens PD-positive utsett i G14 og G15 har høyere melaninprevalens (Figur S1B i Vedlegg). Det som utmerker seg i datasett 2, er at forskjellene mellom PD positive og PD negative utsett er kun tilstede i generasjonene med høyest melaninprevalens ($> 27\%$ median prevalens) (G08-G09 og G14-G15). Generasjonene som har median prevalens lavere enn 26%, viser ingen forskjell i melaninprevalensen mellom PD status (G10 - G13).

I datasett 3 er det ingen forskjell i melaninprevalens mellom PD positive og negative utsett i generasjonene som er inkludert i datasettet.

Effekt av HSMB- eller CMS-status (positiv eller negativ diagnose i løpet av utsett)

Det ble ikke funnet noen forskjell i prevalens av melaninflekker mellom HSMB positive og negative slaktepartier i noen av datasettene (Figur 5A, B og C). Det var heller ingen forskjell i melaninprevalens mellom CMS positive og negative slaktepartier i datasettene (Figur 5A, B og C). I datasett 2 var det få registreringer som var HSMB- eller CMS-positive, og en kan derfor ikke utelukke en mulig effekt av HSMB eller CMS på melaninprevalensen ut ifra resultatene i dette datasettet.

Når vi plottet melaninprevalensen i HSMB og CMS positive og negative utsett fordelt på generasjoner, varierte denne mellom generasjoner i datasett 1. Det var derfor ingen klar trend som viste at HSMB eller CMS positive utsett hadde høyere eller lavere prevalens sammenlignet med negative utsett (Figur S1A i Vedlegg). Regresjonsanalysene viser imidlertid et noe mer nyansert bilde (se kapittel 6.6).

I datasett 2 (Figur S1B i Vedlegg) og 3 var det heller ingen forskjeller i melaninprevalens mellom HSMB eller CMS positive og negative utsett når vi så på hver enkelt generasjon.

Håndteringsdødelighet i løpet av utsett

I tillegg til virussykdommer, ble dødelighet i forbindelse med håndtering inkludert i analysen i datasett 2 (Figur 5B) og datasett 3 (Figur 5C). Håndteringsdødelighet ble formatert til en kategorisk ja/nei-variabel hos de slaktepartiene som har registrert håndteringsdødelighet i løpet av utsett. I datasett 2 hadde slaktepartier som hadde registrert håndteringsdødelighet en høyere melaninprevalens sammenlignet med de som ikke har registrert håndteringsdødelighet i løpet av utsett ($p < 0.05$). Det ble også påvist en korrelasjon på 25% mellom melaninprevalens og håndteringsdødelighet i datasett 2 ($p < 0.05$).

I datasett 3 var det ingen effekt av håndteringsdødelighet på prevalensen av melaninflekker.

Når vi så på effekten av håndteringsdødelighet på melaninprevalensen mellom generasjoner, så vi ingen klare forskjeller i prevalensen i datasett 2 (Figur S1B i Vedlegg) og datasett 3.

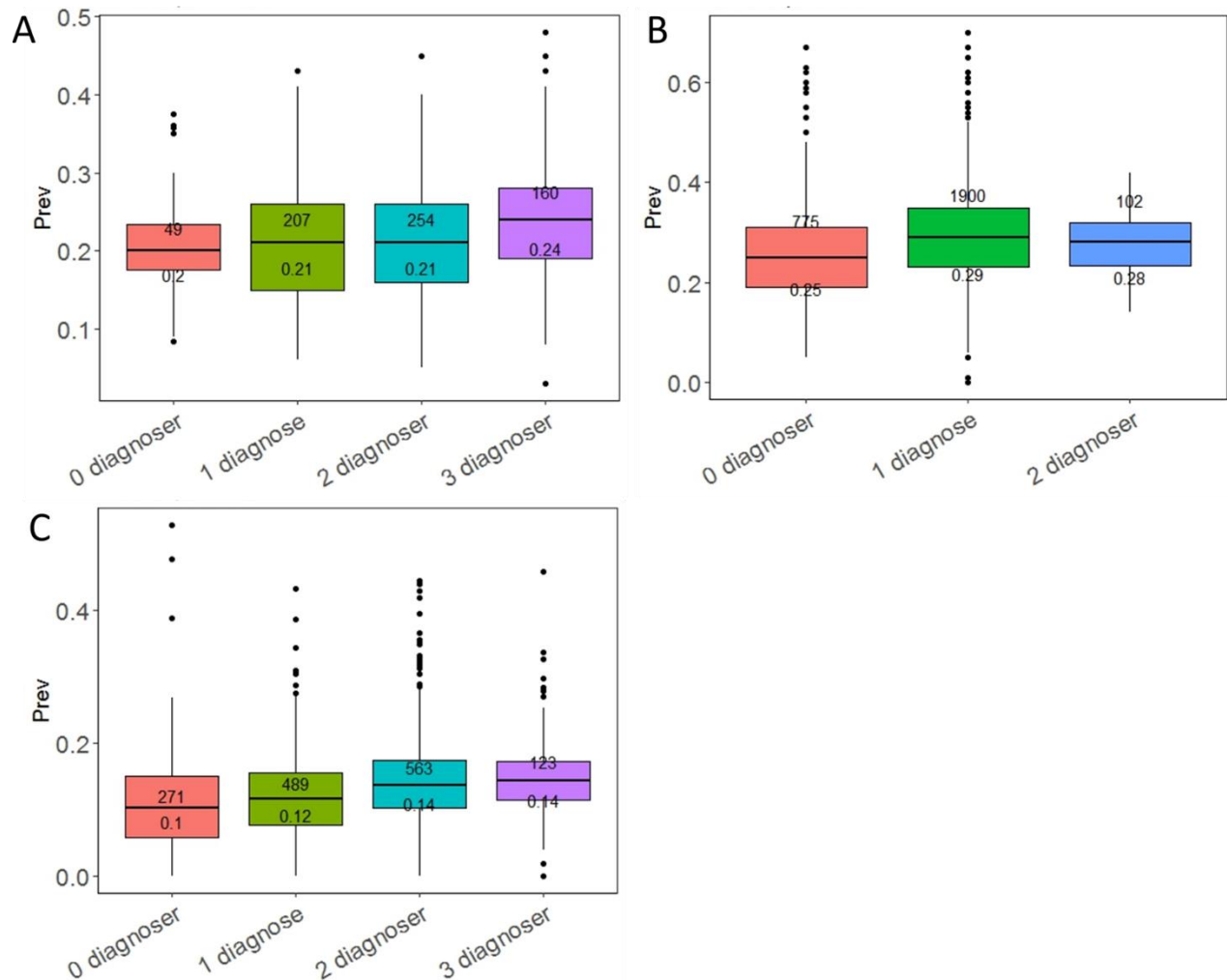
Prevalensen av melaninflekker fordelt på antall virusdiagnoser per utsett

Flere diagnoser av virussykdommer i løpet av et utsett kan bety økt antall risikofaktorer som fisken utsettes for, og kan dermed påvirke prevalensen av melaninflekker ved slakt. Figur 6 viser effekten på prevalensen av melaninflekker i slaktepartier fra utsett som har enten 0, 1, 2 eller 3 diagnoser av virussykdommer registrert i løpet av sjøperioden. Datasett 1, 2 og 3 er vist i hhv. Figur 6A, 6B og 6C. Når en vurderer resultatene i denne figuren, er det viktig å ha med at for hvert utbrudd av en virussykdom vil en andel av fisken i anlegget gå ut i varierende grad, og dermed påvirke hvilke type fisk som til slutt blir slaktet, og andelen fisk som er av tilstrekkelig kvalitet for å bli filéert. Denne usikkerheten vil bli redusert hvis en har detaljert informasjon på merdnivå.

Plottene i Figur 6 viser en trend mot høyere prevalens med økende antall virusdiagnoser, hvor det er størst forskjell i prevalens mellom utsettene som ikke har hatt fått diagnostisert noen virussykdommer og utsett som har fått diagnostisert alle tre sykdommene i løpet av tiden i sjø.

Det må bemerkes at av utsettene som ikke hadde fått registrert virusdiagnoser i datasett 1 (Figur 6A, «0 diagnoser») var 47 registreringer (av totalt 49 registreringer) fra gruppen «Flyttet til lok». Fisk som er i «Flyttet til lok»-gruppen er fisk som ikke har fullstendig historikk på fra utsett i sjø i datasettet. Vi kan derfor ikke utelukke at denne fisken kommer fra lokaliteter som har opplevd et utbrudd med PD, HSMB eller CMS. De to registreringene i gruppen «0 diagnoser» i datasett 1 som hadde informasjon fra utsett hadde en median prevalens på 22%. Dette viser hvor viktig fullstendig informasjon om fiskegruppene er for å hindre misvisende konklusjoner og å ekskludere grupper hvor en ikke har fullstendig informasjon fra utsett i sjø.

Figur S2 i Vedlegg viser hvordan håndteringsdødelighet registrert i datasett 2 og 3 påvirker prevalensen av melaninflekker i utsett kategorisert etter antall virusdiagnoser. I datasett 2 ser en at utsettene som har registrert én virusdiagnose i tillegg til håndteringsdødelighet i løpet av tiden i sjø, har betydelig høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som bare har registrert håndteringsdødelighet (Figur S2A i Vedlegg). I utsettene som ikke har registrert håndteringsdødelighet i datasett 2 er det liten effekt av antall virusdiagnoser per utsett (Figur S2A i Vedlegg). I Figur S2A er det noen utsett som ikke har registrert noe informasjon om håndteringsdødelighet og disse vises i sup-plottet merket «NA». I datasett 3 er det liten forskjell i prevalens av melaninflekker mellom utsett som har registrert håndteringsdødelighet eller ikke (Figur S2B i Vedlegg).



Figur 6. Prevalensen av flekker fordelt på utsett som har fått diagnostisert enten 0, 1, 2 eller 3 av virussykdommene PD, HSMB eller CMS i datasett 1 (A), datasett 2 (B) og datasett 3 (C). 0 diagnoser: Utsett som ikke har fått diagnostisert noen av virussykdommene PD, HSMB eller CMS i løpet av tiden i sjø. 1 diagnose: Utsett som har fått diagnostisert én av de aktuelle virussykdommene i løpet av utsettet. 2 diagnoser: Utsett som har fått diagnostisert to av de aktuelle virussykdommene i løpet av utsettet. 3 diagnoser: Utsett som har fått diagnostisert PD, HSMB og CMS i løpet av utsettet. Streken i boksen indikerer medianen, nedre og øvre kant av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene. Den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt inter-quartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene. Tallet over medianstreken er antallet observasjoner som er inkludert i hver subgruppe. Tallet under medianstreken er median prevalens for subgruppen.

Interaksjon mellom spesifikke virusdiagnoser i samme utsett

Effekten på prevalensen av melaninflekker av en kombinasjon av forskjellige virussykdommer har vist seg å påvirke prevalensen av melaninflekker i oppdrettet atlantisk laks. Jimenez og medarbeidere registrerte en mulig høyere prevalens av flekker i fiskegrupper som hadde fått diagnostisert PD og CMS eller PD og IPN sammenlignet med fiskegrupper som bare har fått diagnostisert PD [12]. Det samme studiet undersøkte også effekten av PD diagnose i kombinasjon med håndteringsstress og innslag av tapere [12].

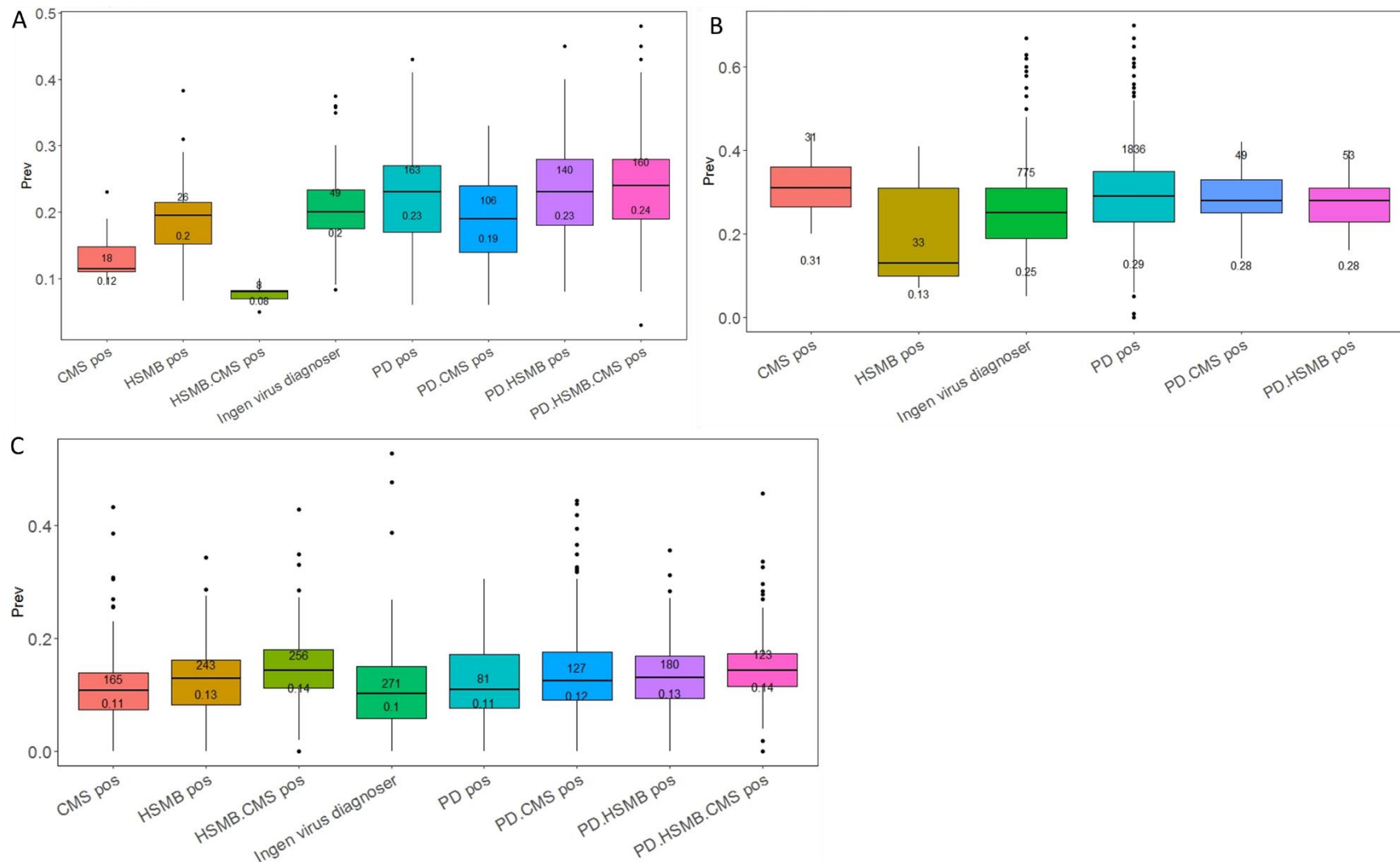
I Figur 7 er prevalensen av melaninflekker plottet for de utsett med kun én spesifikk virusdiagnose og utsett med ulike kombinasjoner av PD-, HSMB- eller CMS-diagnoser i løpet av tiden i sjø.

I Figur 7A (datasett 1) er det vanskelig å vurdere den reelle prevalensen av utsettene med ingen virusdiagnoser siden majoriteten av disse registreringene kommer fra gruppen «Flyttet til lok». Med unntak av CMS positive utsett, ser det ikke ut til at utsett med bare én diagnose i løpet av utsettet har lavere

prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som har fått to eller tre diagnoser i løpet av tiden i sjø. Videre virker det som at en spesifikk kombinasjon av to virusdiagnoser ikke skiller seg ut mtp prevalens av flekker.

I Figur 7B (datasett 2) har utsettene som ikke har fått noen virusdiagnoser i løpet av utsettet en trend mot lavere prevalens av flekker sammenlignet med utsett som har fått diagnostisert en eller to virussykdommer. I dette datasettet er det stor forskjell i antallet registreringer som har fått diagnostisert HSMB eller CMS sammenlignet med PD-positive registreringer. Dette gjør at en ikke kan konkludere mtp effekten av disse to virusdiagnosene alene og effekten på prevalensen av flekker. I Figur S3A i Vedlegg er prevalensen av flekker til utsett med spesifikke virusdiagnoser fortelt på om de samme utsettene har registrert håndteringsdødelighet eller ikke. I gruppen av utsett som har registrert håndteringsdødelighet, ser en at utsettene som er PD-positive har høyest prevalens av melaninflekker (median prevalens på 31%) (Figur S3A i Vedlegg). Med unntak av en lav prevalens i HSMB positive utsett, er det liten forskjell i prevalens i gruppen som ikke har registrert håndteringsdødelighet (Figur S3A i Vedlegg).

I Figur 7C (datasett 3) ser en også en svak trend mot høyere prevalens av melaninflekker i utsett med 1-3 virusdiagnoser i løpet av samme utsett. Denne trenden virker som er uavhengig av hvilke virussykdommer som er kombinert i utsettene. CMS og PD-positive utsett viser imidlertid lik prevalens av flekker som utsettene uten diagnoser. Når virusdiagnosene ble fordelt på om utsettene har registrert håndteringsdødelighet eller ikke, ser en at PD-positive utsett som også har registrert håndteringsdødelighet (N=6) har en høyere prevalens (median prevalens på 24%) sammenlignet med andre diagnosekategorier i datasett 3 (Figur S3B i Vedlegg). Blant utsettene som ikke har registrert håndteringsdødelighet i datasett 3, er det utsettene som har fått diagnostisert både HSMB og CMS i løpet av tiden i sjø som har høyest prevalens (median prevalens på 17%) (Figur S3B i Vedlegg).

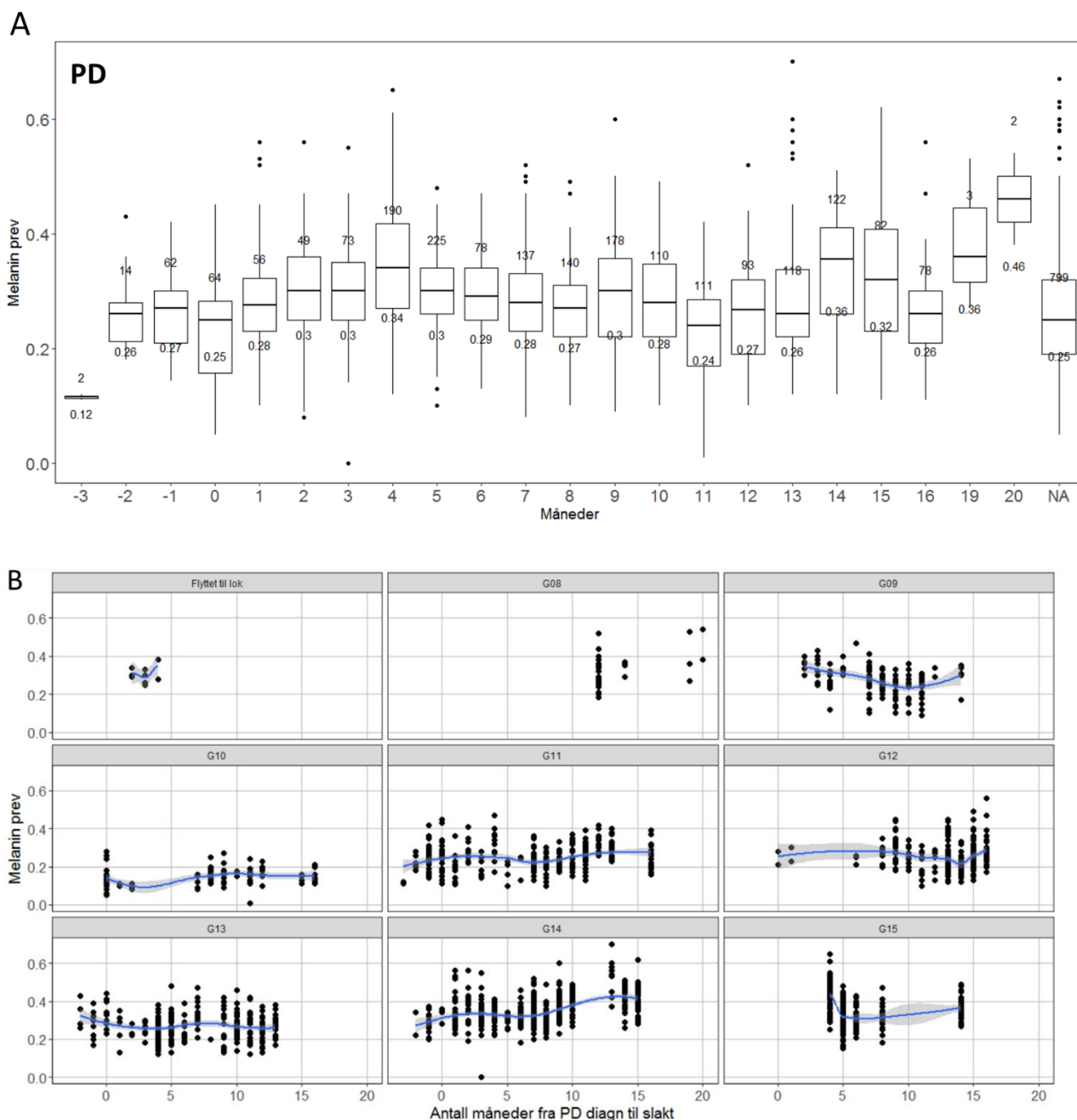


Figur 7. Prevalensen av flekker fordelt på enkeltdiagnoser eller kombinasjoner av diagnoser registrert i løpet av et utsett i datasett 1 (A), datasett 2 (B) og datasett 3 (C). Se kapittel 5.5 for beskrivelse av diagnosekategoriene. Streken i boksen indikerer medianen, nedre og øvre kant av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene. Den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt inter-quartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene. Tallet over medianstreken er antallet observasjoner som er inkludert i hver subgruppe. Tallet under medianstreken er median prevalens for subgruppen.

Effekt av tid mellom første PD-diagnose og slakt

Figur 8 viser hvordan prevalensen av melaninflekker i datasett 2 varierer med antall måneder fra første PD-diagnose ble satt av Veterinærinstituttet til slakt. I Figur 8A er alle generasjonene presentert samlet, og i Figur 8B er generasjonene presentert i egne plot. Når diagnosen er satt samme måneden som fisken slaktes, er dette registrert som «0» i figuren, og negative tall viser melaninprevalensen i slaktepartier som har blitt slaktet før PD-diagnosen har blitt satt på lokaliteten. På grunn av en mulig forsinkelse i tid mellom start av et utbrudd og tidspunktet diagnosen blir satt, kan en ikke utelukke at denne fisken har vært klinisk syk tidligere, og derfor ha en eventuell påvirkning på melaninprevalensen. Helt til høyre i figuren er det en gruppe som heter «NA», og dette er utsett som har vært negative for PD gjennom hele sjøperioden. Figur 8A viser at prevalens av melaninflekker varierer med antall måneder fra første PD-diagnose blir stilt. Når en skal tolke denne figuren, er det viktig å ta med at prevalensen av flekker trolig også er påvirket av tid i sjø uavhengig av virussykdom (dvs. en gradvis økning i prevalens av flekker med økt tid i sjø).

Figur 8B viser at forholdet mellom melaninprevalens og antall måneder etter første PD-diagnose varierer mellom generasjoner. Dette er viktig informasjon når en skal vurdere effekten av diagnosetidspunktet for PD på prevalensen av melaninflekker.



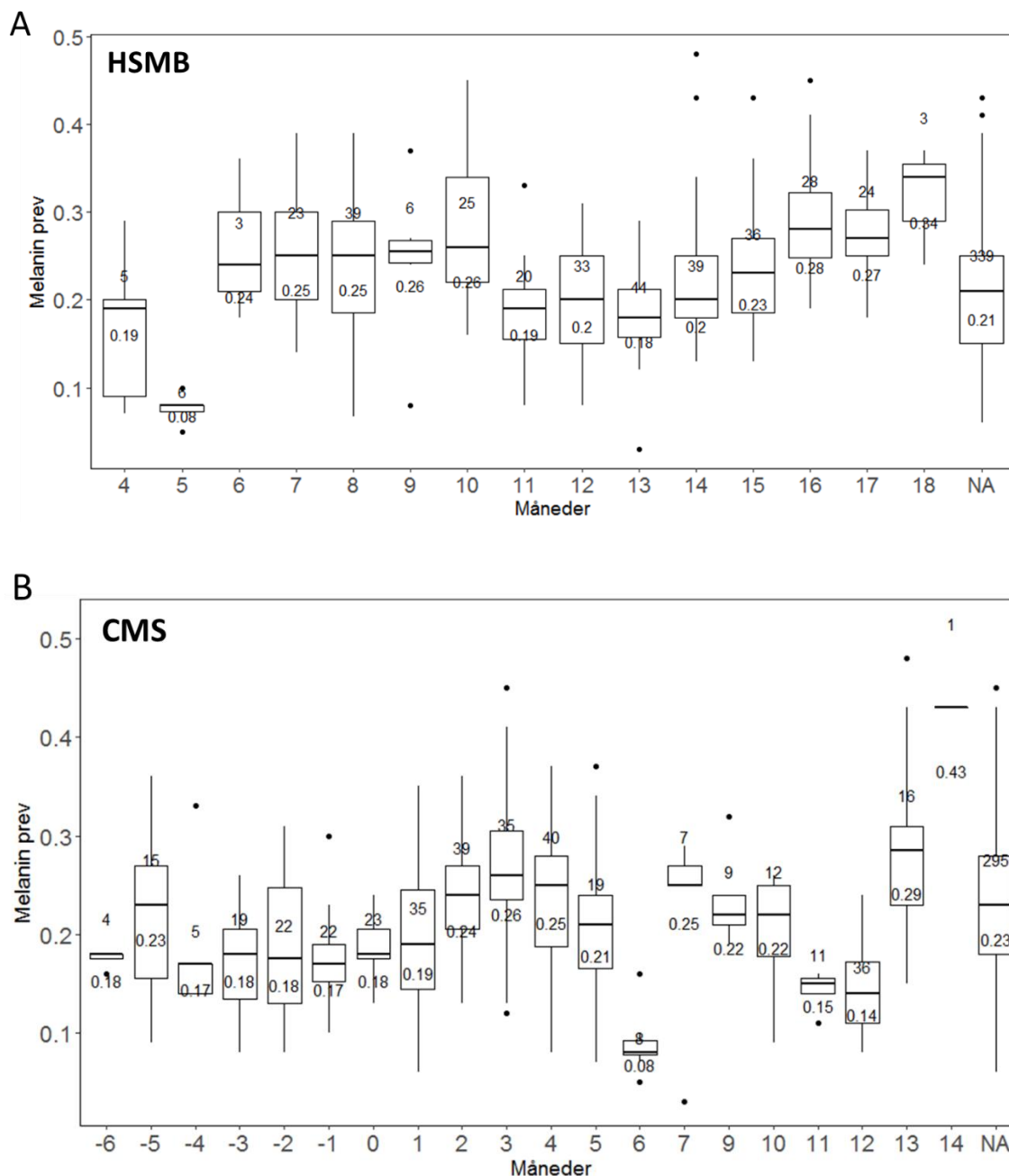
Figur 8. Prevalensen av flekker og antall måneder fra PD diagnose satt av Veterinærinstituttet fram til slakt. (A) Hele datasettet samlet og (B) fordelt på generasjon. 0: Diagnosen ble satt samme måned som fisken ble slaktet ut. Negative tall: Diagnosen ble satt på anlegget etter at melaninprevalensen ble registrert på dette slaktepartiet, men før hele utsettet var slaktet ut. NA: antall slakteparti som kommer fra anlegg som ikke har blitt diagnostisert med den respektive sykdommen i løpet av utsettet. Streken i boksen indikerer medianen, nedre og øvre kant av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene. Den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt inter-quartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene. Tallet over medianstreken er antallet observasjoner som er inkludert i hver subgruppe. Tallet under medianstreken er medianen for subgruppen. Trendlinjen i (B) er en Loess (local polynomial regression fitting) smoother linje, hvor det grå området indikerer et 95 % konfidensintervall.

Effekt av tid mellom første HSMB- og CMS-diagnose og slakt

Figur 9 viser hvordan prevalensen av melaninflekker varierer med antall måneder etter første diagnose av HSMB (Figur 9A) og CMS (Figur 9B) frem til slakt i datasett 1. Når diagnosen er satt samme måneden som fisken slaktes, er dette registrert som «0» i figuren, og negative tall viser melaninprevalensen i slaktepartier som har blitt slaktet før HSMB/CMS-diagnosen har blitt satt på lokaliteten. Som ved PD, kan en ikke utelukke

en mulig forsinkelse i tid mellom start av et utbrudd og diagnosetidspunktet. En kan derfor ikke utelukke at denne fisken har vært klinisk syk tidligere, og derfor ha en eventuell påvirkning på melaninprevalensen. Helt til høyre i figuren er det en gruppe som heter «NA», og dette er utsett som har vært negative for HSMB/CMS gjennom hele sjøperioden.

Melaninprevalens varierer med tid fra HSMB/CMS diagnose til slakt (Figur 9) og viser en liknende trend som for PD (Figur 8). Mer detaljerte data på merdnivå er nødvendig for å kunne konkludere på om dette er reelle effekter av tid fra diagnose.



Figur 9. Prevalensen av flekker og antall måneder fra HSMB (A) og CMS (B) diagnose satt av Veterinærinstituttet til slakt i datasett 1. 0: Diagnosen ble satt samme måned som fisken ble slaktet ut. Negative tall: Diagnosen ble satt på anlegget etter at melaninprevalensen ble registrert på dette slaktepartiet, men før hele utsettet var slaktet ut. NA: antall slakteparti som kommer fra anlegg som ikke har blitt diagnostisert med den respektive sykdommen i løpet av utsettet. Streken i boksen indikerer medianen, nedre og øvre kant av boksen korresponderer til 25 og 75 prosentilene. Den øvre og nedre halen til boksen strekker seg til den minste verdien som er 1.5 x distansen mellom 25 og 75 prosentilene (også kalt inter-quartile range). Uteliggere er indikert med svarte punkter over og under boksene. Tallet over medianstreken er antallet observasjoner som er inkludert i hver subgruppe. Tallet under medianstreken er medianen for subgruppen.

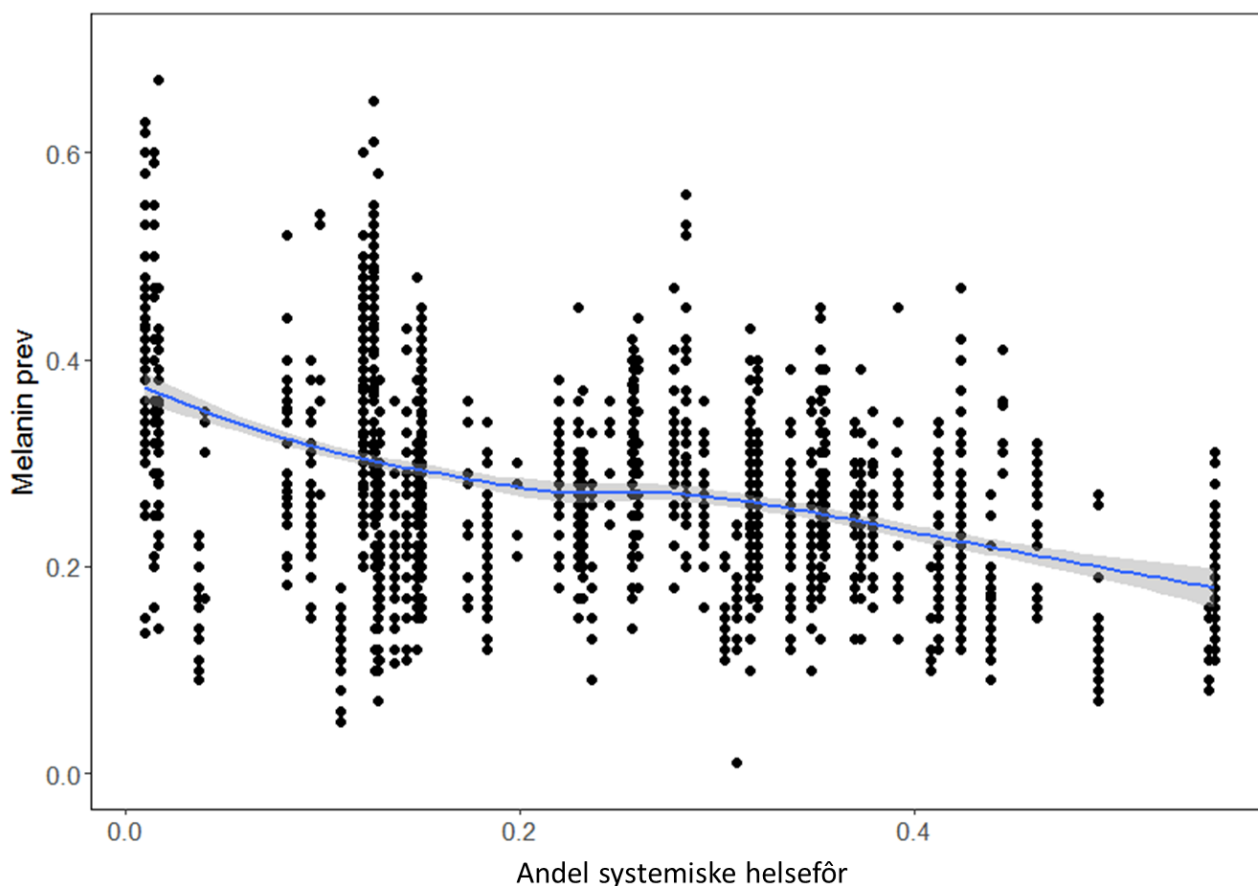
6.5. Effekt av helsefôr

En gradvis reduksjon i andelen marine råvarer i fôret til oppdrettet atlantisk laks har blitt pekt på som en mulig forklaring til den økende prevalensen av melaninflekker de siste 20 årene [2]. Bruk av helsefôr ble inkludert i analysen av datasett 2 for å se etter en eventuell effekt av dette på prevalensen av melaninflekker. På grunn av tidsbegrensninger i prosjektet og kompleksiteten i de ulike fôrreseptene, samt det å beregne andel marine råvarer og andre komponenter i de ulike fôrtypene, ble fôrtypene inndelt i ordinært vekstfôr og helsefôr. Medisinfôr ble ekskludert fra analysen. Helsefôr ble videre inndelt i to kategorier; slimhinne helsefôr og systemiske helsefôr. Dette ble gjort på bakgrunn av de anbefalte formål produsentene har satt på de ulike helsefôr-typerne. Slimhinne helsefôr er fôr som skal virke støttende på funksjonen til slimlagene hos fisken, og systemiske helsefôr består av ulike type fôr som skal virke støttende på immunsystemet og generelle fysiologiske funksjoner hos fisken, som fordøyelighet av fôr.

Det må presiseres at disse resultatene kun peker på trender i effekten på melaninprevalensen, og mer detaljerte studier er nødvendig for å avdekke mekanismene bak en eventuell sammenheng og hvilke komponenter i helsefôrene som gir effekt på dannelsen av melaninflekker.

Andelen utfôret helsefôr ble beregnet ut ifra totalt antall kg utfôret fôr per utsett på hver lokalitet. Andelen av underkategoriene av helsefôr ble også beregnet ut ifra totalt antall kg utfôret fôr per utsett på hver lokalitet.

Når vi plottet andel systemiske helsefôr (dvs. andel utfôret systemiske helsefôr av den totale mengden fôr utfôret på lokaliteten i løpet av utsettet) så vi en reduksjon i melaninprevalens med økende andel utfôret systemiske helsefôr (Figur 10). Det var ingen liknende trend når vi plottet andel slimhinne helsefôr av totalt utfôret fôr på utsettene (upubliserte data). Disse resultatene må verifiseres av mer detaljerte studier og analyser, før en kan konkludere helt sikkert på denne effekten.



Figur 10. Prevalensen av flekker plottet mot andel systemiske helsefôr (beregnet av totalt utfôret systemiske helsefôr i forhold til totalt utfôret fôr på lokalitetsnivå på det respektive utsettet). Linjen er en Loess (local polynomial regression fitting) smoother linje, hvor det grå området indikerer et 95 % konfidensintervall.

Det var ingen forskjeller i effekten på melaninprevalensen og andel systemiske helsefôr mellom PD positive og negative utsett eller mellom vår- og høst-utsett. Det var for få HSMB- og CMS-positive utsett i datasett 2 for å kunne trekke noen slutninger på disse sykdommene.

6.6. Regresjonsanalyse av risikofaktorer

Risikofaktorer som kan påvirke dannelsen og prevalensen av melaninflekker i oppdrettet atlantisk laks har blitt undersøkt i flere studier [2, 5, 8, 12]. Resultatene fra disse studiene viser at både virussykdommer og faktorer relatert til produksjonen påvirker prevalensen av flekker i filét hos atlantisk laks.

I dette prosjektet ble hvert datasett analysert hver for seg, og en oversikt over hvilke forklaringsvariabler (risikofaktorer) som ble brukt i analysen i hvert datasett er gitt i Tabell 4. Det ble brukt en lineær mixed effekt regresjons modell med en random-effekt på generasjon. Ved å ta med random-effekt på generasjon i modellen, tar vi høyde for variasjonen i prevalensen av melaninflekker mellom generasjoner. Forklaringsvariabler som ble inkludert i de ferdige modellene i hvert datasett var alle signifikante ($p < 0.05$), og både Akaike's information criteria (AIC) og Bayesian information criterion (BIC) ble brukt til å evaluere hver modell.

I forkant av alle regresjonsanalysene ble data fra fisk merket «Flyttet til lok» ekskludert i datasettene brukt i analysene. Dette ble gjort for å bare inkludere slaktegrupper hvor vi hadde informasjon om fisken helt fra utsett av smolt i sjø til slakt.

Tabell 4. Oversikt over forklaringsvariablene som er inkludert i de ulike datasettene og regresjonsanalysene. X indikerer hvilke variabler som er inkludert i de ulike datasettene.

		Datasett 1	Datasett 2	Datasett 3
Melanin prevalens	%	X	X	X
Individuell melaninscore	Kont., num	X		
Utsett	Vår/Høst	X	X	X
Snittvekt ved utsett på lok nivå	g	X	X	
Lengde og breddegrad	Kont., num	X	X	X
% akkumulert dødelighet	%	X	X	X
Produksjonsform	Konv/øko	X		
PD status (positiv/negativ)*	0/1	X	X	X
HSMB status (positiv/negativ)*	0/1	X	X	X
CMS status (positiv/negativ)*	0/1	X	X	X
Håndtering dødelighet (ja/nei)	0/1		X	X
Ant mndr fra PD/HSMB/CMS diagn til slakt	Kont., num	X	X	
Antall forskjellige virusdiagnoser per utsett**	0, 1, 2, 3	X	X	X
Kombinasjon av virusdiagnoser per utsett***	Kategorisk	X	X	X
Badebehandlet mot lus (ja/nei)	0/1			X
Antall badebehandlinger	Kategorisk			X
Antall måneder i sjø	Kont., num	X	X	
Alder ved utsett	(0-, 1- og 1.5-åring)			X
SGR ^a	Kont., num		X	
eFCR ^b	Kont., num		X	
bFCR ^c	Kont., num		X	
Andel internal-helsefôr av tot.utfôret	%		X	
Andel mucosa-helsefôr av tot.utfôret	%		X	

* diagnose på lokalitetsnivå av PD, HSMB eller CMS registrert i løpet av et utsett hentet fra journalsystemet til Veterinærinstituttet.

** Antall forskjellige diagnoser av PD, HSMB eller CMS registrert i løpet av et utsett. 0: ingen diagnoser registrert, 1: bare en virusdiagnose registrert, 2: to forskjellige virusdiagnoser registrert og 3: tre forskjellige virusdiagnoser registrert

*** Kombinasjon av PD, HSMB og CMS diagnoser registrert i løpet av et utsett (se kapittel 5.5 for nærmere forklaring).

Kont.: kontinuerlig, num: numerisk. ^aSGR: specific growth rate, ^beFCR: economic feed conversion rate, ^cbFCR: biological feed conversion rate

Korrelasjon mellom forklaringsvariabler

I forkant av regresjonsanalysen ble korrelasjonen mellom forklaringsvariablene undersøkt. Binære og kategoriske variabler ble undersøkt med Spearman's rank korrelasjonsanalyse, og kontinuerlige numeriske variabler ble undersøkt med Pearson korrelasjonsanalyse. Ingen korrelasjoner over 70% (forhåndsdefinert grenseverdi) ble funnet i noen av datasettene, og derfor ble ingen variabler utelukket fra regresjonsanalysen av de respektive datasettene.

6.6.1. Datasett 1

Analyse av individdata av melaninscore i datasett 1

Denne analysen så på effekten av sykdomsstatus av virus sykdommene PD, HSMB og CMS på melaninscore på individnivå i et parallell datasett til datasettet med prevalensdata. Denne analysen ble gjort for å vurdere verdien av å bruke melaninscore på individnivå sammenlignet med prevalensdata på gruppenivå. I denne analysen ble det brukt random effekt på lokalitet.

Resultatet viste at PD og CMS positive utsett har svakt høyere sannsynlighet for en høyere individuell melaninscore. PD har mest effekt (Odds Ratio 1.39) og CMS en liten effekt (Odds Ratio 1.08). HSMB sykdomsstatus har ingen effekt på individuell melaninscore (Odds Ratio 0.93). Videre forklarte PD positive utsett 30% av variasjonen av melaninscoren på individnivå. Det ble ikke funnet konfundering mellom PD sykdomsstatus og CMS sykdomsstatus i dette datasettet. Dette betyr at PD sykdomsstatus og CMS sykdomsstatus påvirker melaninscoren uavhengig av hverandre, selv om et slakteparti kommer fra et anlegg med begge diagnosene. Dette er viktig informasjon når en skal vurdere effekten av de ulike virus sykdommene på individuell melaninscore.

Univariat analyse av melaninprevalens på slakteparti-nivå

Denne analysen ble gjennomført ved at en og en forklaringsvariabel ble analysert i regresjonsanalysen for å avdekke i hvilken grad melaninprevalensen ble forklart av denne variabelen. Dette ble gjort for å se hvilke av forklaringsvariablene som hadde forklaringskraft og dermed ble med videre til multivariabel-regresjonen.

Forklaringsvariablene ble vurdert ut fra om modellen hadde en mindre AIC- og BIC-verdi sammenlignet med 0-modellen til datasett 1 og om modellen var signifikant bedre sammenlignet med 0-modellen i en ANOVA-test. 0-modellen for datasett 1 med random effekt på generasjon viste en $R^2 = 0.04$ (se figur S4 i Vedlegg for detaljer). Dette viser at når en tar høyde for variasjonen i prevalens av melaninflekker mellom generasjoner med en random effekt på generasjon, forklarer 0-modellen i liten grad variasjonen i melaninprevalens.

I datasett 1 var N=47 av totalt 49 registreringer som ikke har fått en virusdiagnose i løpet av utsett i gruppen «Flyttet til lok». Siden «Flyttet til lok»-gruppen var ekskludert fra datasettet som ble brukt inn i regresjonsanalysene, gir dette kun N=2 registreringer (22% median prevalens) som ikke har fått en virusdiagnose i løpet av utsett. Disse to registreringene ble derfor ekskludert fra datasettet brukt i regresjonsanalysene.

På grunn av skjev fordeling av antall registreringer mellom generasjonene i variabelen Antall måneder i sjø, ble registreringer som hadde under 15 og over 23 måneder i sjø tatt ut av datasettet inn i regresjonsanalysene.

Variablene som pekte seg ut univariat-analysen av datasett 1 var Antall virusdiagnoser per utsett, Spesifikk diagnose per utsett, Produksjonstype (Økologisk og Ordinær) og Antall måneder i sjøen (Tabell 5).

Tabell 5. Oversikt over resultater fra univariat analysene med random effekt på generasjon i datasett 1.

Modell	Forklaringsvariabel	Ref.	R ²	Koeffisient	p-verdi
1	2 virusdiagnoser registrert per utsett*	1 virusdiagnose	0.13	0.002	0.87
1	3 virusdiagnoser registrert per utsett*	1 virusdiagnose	0.13	0.05	< 0.0001
2	Kun HSMB diagnose på utsettet**	Kun PD diagnose på utsettet	0.17	0.01	0.73
2	CMS diagnose på utsettet**	Kun PD diagnose på utsettet	0.17	-0.06	< 0.01
2	PD + CMS diagnose på utsettet**	Kun PD diagnose på utsettet	0.17	-0.002	0.90
2	PD + HSMB diagnose på utsettet**	Kun PD diagnose på utsettet	0.17	-0.04	< 0.05
2	PD + HSMB + CMS diagnose på utsettet**	Kun PD diagnose på utsettet	0.17	0.03	< 0.05
3	Produksjonstype (Økologisk og Ordinær)	Ordinær	0.10	-0.05	< 0.01
4	Antall måneder i sjøen	-	0.18	0.013	< 0.0001

* Antall forskjellige diagnoser av PD, HSMB eller CMS registrert i løpet av et utsett (se kapittel 5.5 for nærmere forklaring).

** Effekt av kun enkeltdiagnoser i løpet av utsettet eller kombinasjon av flere diagnoser per utsett

Analysen viser at Antall virusdiagnoser alene forklarer 13% av variasjonen i melaninprevalensen i datasett 1. Denne modellen indikerer at utsett med to og tre virusdiagnoser gir en svakt høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som har bare én virusdiagnose. Modellen med spesifikk virusdiagnose viser varierende assosiasjon og signifikans mellom prevalensen av melaninflekker og utsett med bare HSMB eller CMS eller med en kombinasjon av flere diagnoser i løpet av utsettet. Variabelen Produksjonstype forklarer alene 10% av variasjonen i melaninprevalensen, og slaktepartier fra økologisk produksjon har lavere prevalens sammenlignet med ordinær produksjon. Videre viser analysen at antall måneder i sjø alene forklarer 18% av variasjonen i melaninprevalensen og at en økning i antallet måneder i sjø gir en svak økning i prevalensen. Dette gir en indikasjon på at tid i sjø kan ha betydning på utviklingen av melaninflekker i dette datasettet; jo lengre tid i sjø jo høyere prevalens av melaninflekker.

Multivariabel-analyse av melaninprevalens

Multivariabel-modellen ga en $R^2 = 0.28$ og indikerer at variablene i modellen i moderat grad forbedrer forklaringen av variasjonen i melaninprevalensen i datasettet, sammenlignet med 0-modellen med random effekt på generasjon (Tabell 6). Ved å beregne intraclass correlation coefficient (ICC) mellom 0-modellen og den ferdige multivariabel-modellen, ser en at i den ferdige modellen blir 1.5% av variasjonen mellom generasjonene blir forklart av forklaringsvariablene i stedet for av random-effekten av generasjon. Når alle variablene ble inkludert i regresjonsanalysen, var Antall virusdiagnoser, sesong for utsett, snittvekt ved utsett og antall måneder i sjø signifikant assosiert med melaninprevalens (Tabell 6). Modellen viser at når vi tar høyde for variasjonen mellom generasjoner, har utsett som har registrert to eller tre virusdiagnoser i løpet av utsettet, en lavere prevalens sammenlignet med utsett som har kun en virusdiagnose registrert i løpet av tiden i sjø. Modellen viser også at høst-utsett har lavere melaninprevalens ved slakt sammenlignet med fisk satt ut i sjø på våren. Dette stemmer med liknende funn gjort av Jimenez og medarbeidere i 2015 [12].

Modellen viser også en svak tendens til at en høyere snittvekt ved utsett gir økt melaninprevalens ved slakt.

Erfaringer fra felt tilsier at prevalensen av melaninflekker er på ca 5% (+/-) når en starter registreringer 4 - 5 måneder etter utsett og stiger gradvis opp til 15-30% frem mot slakt. Jimenez og medarbeidere viste denne sammenhengen i et feltstudie, hvor økt tid i sjø ga høyere melaninprevalens ved slakt [12]. I analysen av

datasett 1 var antall måneder i sjø positivt assosiert med melaninprevalens, dvs at prevalensen ble marginalt økt ved stigende antall måneder i sjø.

Vi undersøkte også hvilken effekt tiden mellom første virusdiagnose på lokaliteten og slakt hadde på melaninprevalensen. I datasett 1 ble det ikke funnet at antall måneder mellom diagnose og slakt forklarte melaninprevalensen bedre sammenlignet med sykdomsstatus av de respektive virussykdommene. Derfor ble ikke disse variablene inkludert i modellen. Modellen ble heller ikke forbedret ved å bytte ut sykdoms-status med variabelen som inkluderte de spesifikke diagnosene og kombinasjonen av diagnoser per utsett.

Tabell 6. Oversikt over mixed effekt modellen med forklaringsvariabler som er signifikant assosiert med prevalens av melaninflekker ved slakt. CI indikerer 95% konfidens intervall. Ytterligere detaljer om modellen er i Figur S5 i Vedlegg

Forklarings-variabler	Koefisient	Std.feil	p-verdi	CI
Intercept	-0.24	0.056		
2 virusdiagnoser registrert per utsett (ref. 1 virusdiagnose)	-0.03	0.01	< 0.05	(-0.06, -0.008)
3 virusdiagnoser registrert per utsett (ref. 1 virusdiagnose)	-0.017	0.01	0.21	(-0.04, 0.01)
Utsett (ref. Vår)	-0.12	0.02	< 0.0001	(-0.16, -0.08)
Snittvekt ved utsett	0.002	0.0002	< 0.001	(0.001, 0.002)
Antall mndr i sjø	0.017	0.002	< 0.0001	(0.01, 0.02)

6.6.2. Datasett 2

Når en skal vurdere effekt av de ulike virussykdommene inkludert i datasett 2, er det viktig å merke seg at svært få slaktepartier kommer fra lokaliteter som har hatt HSMB eller CMS i løpet av sjøfasen. Denne skjevheten gjør at vi ikke kan utelukke en eventuell effekt av disse virussykdommene på melaninprevalensen.

Når vi tar høyde for variasjonen i prevalens av melaninflekker mellom generasjoner med en random effekt på generasjon, ga 0-modellen en $R^2 = 0.45$ (se figur S6 i Vedlegg for detaljer). Dette viser at med en random effekt på generasjon forklarer denne modellen en stor del av variasjonen i melaninprevalens, og dette må tas med når en vurderer verdien av R^2 til regresjonsmodellene i dette datasettet.

På grunn av skjev fordeling av antall registreringer mellom generasjonene i variabelen Antall måneder i sjø, ble registreringer som hadde under 13 og over 22 måneder i sjø tatt ut av datasettet inn i regresjonsanalysene.

Univariat analyse av melaninprevalens på slakteparti-nivå

Forklaringsvariablene ble vurdert utfra om modellen gir en mindre AIC- og BIC-verdi sammenlignet med 0-modellen, og om modellen var signifikant bedre sammenlignet med 0-modellen i en ANOVA-test. Det er viktig å presisere at siden 0-modellen alene gir en $R^2 = 0.45$, kan ikke endringer i R^2 -verdien brukes alene for å vurdere i hvilken grad den enkelte forklaringsvariablen forklarer melaninprevalensen i univariat-modellene. En må derfor bruke reduksjonen i AIC- og BIC-verdiene og resultatet fra ANOVA-testen i tillegg til R^2 -verdien for å vurdere univariat modellen.

Variablene som ga en signifikant bedre modell sammenlignet med 0-modellen var Antall virusdiagnoser per utsett, Spesifikk diagnose per utsett, PD status, CMS status, Håndteringsdødelighet, Andel systemiske helsefôr, Antall måneder i sjø og Akkumulert dødelighet (Tabell 7).

Tabell 7. Oversikt over resultater fra univariat-analysene med random effekt på generasjon i datasett 2.

Modell	Forklaringsvariabel	Ref.	R ²	Koeffisient	p-verdi
1	Kun 1 virusdiagnose registrert per utsett*	Ingen diagnoser registrert	0.467	0.014	< 0.01
1	2 virusdiagnoser registrert per utsett*	Ingen diagnoser registrert	0.467	0.047	< 0.001
2	PD-status**	Positiv	0.465	-0.02	< 0.01
3	CMS-status***	Positiv	0.455	-0.04	< 0.01
4	Håndteringsdødelighet	Ja	0.44	-0.02	< 0.01
5	Kun PD diagnose på utsett****	Ingen diagnoser registrert	0.47	0.017	< 0.001
5	Kun HSMB diagnose på utsett****	Ingen diagnoser registrert	0.47	-0.047	< 0.01
5	PD + CMS diagnose på utsett****	Ingen diagnoser registrert	0.47	0.05	< 0.001
5	PD + HSMB diagnose på utsett****	Ingen diagnoser registrert	0.47	0.04	< 0.01
6	Andel systemiske helsefôr	-	0.43	-0.17	< 0.001
7	Antall måneder i sjø	-	0.49	0.013	< 0.001
8	Log(Akkumulert dødelighet)	-	0.454	0.012	< 0.001

* Antall forskjellige diagnoser av PD, HSMB eller CMS registrert i løpet av et utsett (se kapittel 5.5 for nærmere forklaring).

** PD har blitt diagnostisert i løpet av utsett

*** CMS har blitt diagnostisert i løpet av utsett. I denne gruppen inneholder kun 80 registreringer fra 4 utsett (fra 4 forskjellige generasjoner og 4 lokaliteter)

**** Effekt av kun enkelt diagnoser i løpet av utsett eller kombinasjon av flere diagnoser per utsett

Modellen viser at utsett med en og to virusdiagnoser i løpet av utsett har høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet utsett som ikke har fått diagnostisert virussykdom. Videre viser modellen med variabelen over spesifikke diagnoser per utsett at alle utsett, med unntak av de som kun har HSMB-diagnose, har høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som ikke har registrert en virusdiagnose. Dette gjenstår å bekrefte siden det er relativt få registreringer som er HSMB og CMS positive i datasett 2.

Analysen viser at forklaringsvariablene PD og CMS sykdomsstatus og håndteringsdødelighet gir en signifikant bedre modell sammenlignet med 0-modellen. Modellene viser at det å være negativ for PD, CMS eller håndteringsdødelighet gir en lavere melaninprevalens ved slakt sammenlignet med utsettene som er positive for disse diagnosene i løpet av tiden i sjø. Resultatet for CMS-status må bekreftes i andre datasett som har en høyere andel CMS-positive registreringer, da det er kun 80 registreringer fra 4 utsett (fra 4 forskjellige generasjoner og 4 lokaliteter) med CMS i datasett 2.

Andelen utført systemiske helsefôr per utsett gir en modell med en redusert R²-verdi sammenlignet med 0-modellen (Tabell 7). Dette er normalt sett et tegn på en dårligere forklaringsmodell, men denne ble likevel trukket frem her på grunn av en betydelig lavere AIC- og BIC-verdi, og fordi modellen var signifikant bedre i en ANOVA-test sammenlignet med 0-modellen. Univariat-modellen med andel systemiske helsefôr indikerer at for hver enhet andel systemiske helsefôr øker, reduseres melaninprevalensen med en koeffisient på 0.17.

Univariat-analysen viste også at Antall måneder i sjø og Akkumulert dødelighet gir en bedre forklaring av melaninprevalensen sammenlignet med 0-modellen. Modellene viser at en økning i antall måneder i sjø og akkumulert dødelighet gir en økt prevalens av melaninflekker ved slakt. Økningen i prevalens med lengden på tid i sjøen er motsatt av det vi fant i datasett 1, men samsvarer med feltefaringer og funn gjort av Jimenez og medarbeidere [12]. Dette viser en forskjell mellom datasett som viser at flere studier er nødvendige før en kan konkludere på denne effekten.

Multivariabel-analyse av melaninprevalens

Multivariabel-modellen ga en $R^2 = 0.464$, og indikerer at variablene i modellen i liten grad forbedrer forklaringen av variasjonen i melaninprevalensen i datasettet sammenlignet med 0-modellen med random effekt på generasjon (Tabell 8). Ved å beregne ICC-verdiene til 0-modellen og den ferdige multivariabel-modellen, ser en at 5% av variasjonen mellom generasjonene blir forklart av forklaringsvariablene i stedet for av random-effekten til generasjon i den ferdige modellen. Forklaringsvariablene var Håndteringsdødelighet, Andel utfôret systemiske helsefôr og Antall måneder i sjø. Modellen viser at utsettene som ikke har registrert håndteringsdødelighet har lavere melaninprevalens sammenlignet med utsett som har hatt håndteringsdødelighet. Videre viser modellen at høyere andel utfôret systemiske helsefôr reduserer melaninprevalensen, og at økt antall måneder i sjø gir en høyere prevalens av melaninflekker ved slakt.

Effekt av tid mellom første virusdiagnose på lokaliteten og slakt ble også analysert og ikke funnet å gi en bedre modell enn når sykdomsstatus ble brukt i modellen. Modellen ble heller ikke forbedret ved å bytte ut sykdoms-status med variabelen som inkluderte de spesifikke diagnosene og kombinasjonen av diagnoser per utsett.

Tabell 8. Oversikt over mixed effekt modellen med forklaringsvariabler som er signifikant assosiert med prevalens av melaninflekker ved slakt. CI indikerer 95% konfidens intervall. Ytterligere detaljer om modellen er i Figur S7 i Vedlegg.

Forklarings-variabler	Koefisient	Std.feil	p-verdi	CI
Intercept	0.106	0.03		
Håndteringsdød. (ref. Ja)	-0.017	0.004	< 0.0001	(-0.02, -0.009)
Andel systemiske helsefôr	-0.156	0.012	< 0.00001	(-0.18, -0.13)
Antall mndr i sjø	0.01	0.001	< 0.0001	(0.009, 0.014)

6.6.3. Datasett 3

0-modellen til datasett 3 med random effekt på generasjon viste en lav $R^2 = 0.09$ (se figur S8 i Vedlegg for detaljer). Dette viser at med en random effekt på generasjon forklarer 0-modellen en liten del av variasjonen i melaninprevalens i dette datasettet.

Univariat analyse av melaninprevalens på slakteparti-nivå

Forklaringsvariablene ble vurdert utfra om modellen hadde en mindre AIC- og BIC-verdi sammenlignet med 0-modellen og om modellen var signifikant bedre sammenlignet med 0-modellen i en ANOVA-test. Forklaringsvariablene var Antall virusdiagnoser per utsett, Spesifikk diagnose per utsett, Lengdegrad, Breddegrad og CMS status var signifikant assosierte med prevalensen av melaninflekker (Tabell 9). R^2 -verdiene til modellene er lave og reflekterer derfor at enkelt-variablene i datasettet i liten grad forklarer variasjonen til melaninprevalensen. Det er derfor kun svake trender som peker seg ut i univariat-analysene og vanskelig å dra noe konkrete konklusjoner fra.

Tabell 9. Oversikt over resultater fra univariat analysene med random effekt på generasjon i datasett 3.

Modell	Forklaringsvariabel	Ref.	R ²	Koeffisient	p-verdi
1	Lengdegrad	-	0.11	0.004	< 0.05
2	Breddegrad	-	0.11	0.003	< 0.05
3	Kun 1 virusdiagnose registrert per utsett*	Ingen diagnoser registrert	0.11	0.005	< 0.05
3	2 virusdiagnoser registrert per utsett*	Ingen diagnoser registrert	0.11	0.005	< 0.001
3	3 virusdiagnoser registrert per utsett*	Ingen diagnoser registrert	0.11	0.008	< 0.05
4	CMS-status**	Positiv	0.11	-0.015	< 0.05
5	Kun PD diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.013	0.13
5	Kun HSMB diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.015	< 0.05
5	Kun CMS diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.005	0.42
5	PD + CMS diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.03	< 0.001
5	PD + HSMB diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.017	< 0.01
5	HSMB + CMS diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.037	< 0.001
5	PD + HSMB + CMS diagnose på utsett***	Ingen diagnoser registrert	0.12	0.018	< 0.05

* Antall forskjellige kategorier av PD-, HSMB- eller CMS-dødelighet registrert i løpet av et utsett (se kapittel 5.3 for nærmere forklaring).

** CMS-dødelighet har blitt registrert i løpet av utsett

*** Effekt av kun enkelt diagnoser i løpet av utsett eller kombinasjon av flere kategorier per utsett

Modellen viser at utsett med en, to eller tre virusdiagnoser i løpet av utsett har trend mot høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet utsett som ikke har fått diagnostisert virussykdom. Videre viser modellen med variabelen over spesifikke diagnoser per utsett at alle utsett, har en trend mot høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som ikke har registrert en virusdiagnose. Lengde- og breddegrad har også en svak effekt på prevalensen av melaninflekker i datasett 3.

Multivariabel-analyse av melaninprevalens

Den ferdige modellen ga en $R^2 = 0.115$, og indikerer at disse variablene forklarer i liten grad variasjonen i melaninprevalensen i dette datasettet sammenlignet med 0-modellen med random effekt på generasjon. Ved å beregne ICC-verdiene til 0-modellen og den ferdige multivariabel-modellen, ser en at 5% av variasjonen mellom generasjonene blir forklart av forklaringsvariablene i stedet for av random-effekten av generasjon i den ferdige modellen. Forklaringsvariablene som var signifikant assosiert med melaninprevalens i sluttmodellen var Lengdegrad, Antall virusdiagnoser per utsett og Sesong for utsett i sjø (Tabell 10). Modellen viser en svak økning i prevalensen av melaninflekker ved slakt hos utsett som er plassert lengre mot øst. Videre har utsett som har fått en, to eller tre virusdiagnoser i løpet av utsett en høyere prevalens sammenlignet med utsett som ikke har fått en virusdiagnose. I datasett 3 har høst-utsett høyere prevalens ved slakt sammenlignet med vår-utsett, noe som bekrefter trenden for datasett 3 som en ser i Tabell 2.

Modellen ble ikke forbedret ved å bytte ut sykdoms-status med variabelen som inkluderte de spesifikke diagnosene og kombinasjonen av diagnoser per utsett.

Tabell 10. Oversikt over mixed effekt modellen med forklaringsvariabler som er signifikant assosiert med prevalens av melaninflekker ved slakt. CI indikerer 95% konfidens intervall. Ytterligere detaljer om modellen er i Figur S9 i Vedlegg.

Forklarings-variabler	Koefisient	Std.feil	p-verdi	CI
Intercept	0.07	0.01		
Lengdegrad (vest-øst)	0.004	0.001	< 0.0001	(0.001, 0.006)
1 virusdiagnose registrert per utsett (ref. Ingen diagnose)	0.01	0.005	=0.06	(-0.0006, 0.02)
2 virusdiagnoser registrert per utsett (ref. Ingen diagnose)	0.02	0.005	< 0.0001	(0.01, 0.03)
3 virusdiagnoser registrert per utsett (ref. Ingen diagnose)	0.002	0.008	0.80	(-0.01, 0.01)
Sesong for utsett i sjø (ref. Vår)	0.025	0.004	< 0.0001	(0.017, 0.03)

7. Diskusjon

Formålet med dette prosjektet var å vurdere kvaliteten på data fra melaninregistreringer fra ulike kilder og i hvilke grad disse datasettene kan brukes i et epidemiologisk studium for å identifisere risikofaktorer for økt prevalens av melaninflekker. Det var ikke et mål å identifisere molekylære mekanismer for dannelsen av melaninflekker, men å peke ut risikofaktorer hvor videre søkelys bør rettes, epidemiologisk og molekylært.

Gjennom arbeidet med datasettene i dette prosjektet har det kommet frem forskjeller mellom datasettene og utfordringer med det å håndtere retrospektive data.

7.1. Forskjeller i registreringen av melanindata

Bruk av FHF-malen gir god normalfordeling av prevalensen av flekker

Histogrammene over fordelingen av melaninprevalensen i Figur 2 viser at metoden som brukes til å registrere melaninflekker trolig påvirker fordelingen av prevalensen av flekker. Datasett 1 og 2 har scoret etter FHF-malen og har en relativt sett normalfordelt melaninprevalens, mens datasett 3 har scoret etter en mindre detaljert mal og har en venstre-forskjøvet fordeling av prevalensen. Denne forskjellen mellom datasettene gjør at resultatene fra datasett 1 og 2 ikke er direkte sammenlignbare med resultatene fra datasett 3.

Utover hvilke mal som brukes til å registrere melaninflekker, vil scoringen og registreringen av melaninflekker være avhengig av bl.a. personellet som gjennomfører scoringen, samt opplæring og oppfølging av disse personene. En mer detaljert mal for registrering av flekker kan stille høyere krav til den som registrer og dermed bedre kvaliteten på dataene som hentes inn på slaktelinjen.

Er prevalensen av flekker på filéert fisk representativ for hele populasjonen på lokaliteten?

For å kunne konkludere på hvilke risikofaktorer som har størst betydning i epidemiologiske studier, er det viktig at utfallsvariabelen (dvs. prevalensen av flekker i laksefilét i dette prosjektet) er representativ for målpopulasjonen (all laks som har stått på lokaliteten). Hvor representativ dataene av utfallsvariabelen er, avhenger primært av seleksjonen av fisken som blir registrert. Normalt sett skjer det en selektering av fisk som går til filétering på bakgrunn av størrelse og kvalitetskategori. Hvor streng seleksjonen blir inn til filéteringslinjen vil også variere etter ulike produksjonskrav mellom ordrene som slakteriene får.

Per dags dato er det kun mulig å score melaninflekker i skjelettmuskel på fileter, og ikke på sløyd fisk. Det betyr at majoriteten av dataene som samles inn på melaninprevalens er registrert på en selektert populasjon av all laks som produseres. Dette kan bety at en bruker data på melaninprevalens som ikke nødvendigvis er representativ for målpopulasjonen; der en skal sette inn tiltak for å redusere problemet med flekker. Alle publiserte rapporter som forsøker å identifisere risikofaktorer for melaninflekker, bruker variabler som er på populasjonsnivå i sine analyser, og dette kan påvirke resultatene fra slike analyser. Det vil derfor være viktig å avklare om melaninprevalensen som registreres på fisken som fileteres er representativ for populasjonen. Dersom subpopulasjonen som undersøkes ikke er representativ, vil vi få en overestimert av prevalens i den egentlige målpopulasjonen.

Optisk skanning av sløyd fisk eller fotografering av enkelt filéer

Optimalt sett kunne en optisk skanning av all sløyd fisk som gikk gjennom et slakteri gitt den reelle prevalensen av flekker i laksen. Det har blitt gjort en del innledende studier på ulike metoder for optisk skanning hvor det ble påpekt flere utfordringer [2], og ytterligere arbeid er nødvendig for å finne en løsning på dette området.

Et annet alternativ er at det blir tatt bilder av hver filet som går gjennom fileteringslinjen. Dette bildet kan bli behandlet i et bildegjenkjenningsprogram som registrerer prevalens, lokalisering og størrelse av flekkene. På denne måten blir alle filéer registrert på samme måte og uavhengig av det tilgjengelige personellet og deres kapasitet til å registrere flekker. Disse dataene kan brukes videre i studier for å identifisere risikofaktorer for melaninflekker.

Et siste alternativ vil være å validere melaninprevalensen på fileteringslinjene med tilfeldige uttak av fisk som filéeres fra populasjonen. På denne måten kan en finne ut hvor representativ prevalensen av flekker er i filéer som produseres og bruke dette inn i analyser som bruker forklaringsvariabler på populasjonsnivå.

7.2. Identifikasjon av risikofaktorer i de ulike datasettene

Regresjonsanalysene (uni- og multivariabel) av alle datasettene fremhevet ulike risikofaktorer som var signifikant assosiert med prevalensen av flekker. Forskjellige risikofaktorer pekte seg ut i analysene av de ulike datasettene. Dette kan forklares med den geografiske forskjellen mellom datasettene, som gir seg utslag i bl.a. forskjellig forekomst av PD, HSMB og CMS i datasettene. Metodene som brukes for å registrere melanindataene vil også kunne påvirke resultatene av disse analysene (diskutert i kapittel 7.1). Denne forskjellen i risikofaktorer som peker seg ut i de ulike datasettene kan tyde på at data som samles inn må behandles etter hvilke geografiske region de kommer fra. Dette kan øke sjansen for å identifisere risikofaktorer av vesentlig betydning for tilstedeværelse av melaninflekker i laksefilet.

Sykdomsstatus

PD positive utsett har tidligere blitt assosiert med høyere prevalens av melaninflekker [2, 12]. HSMB og CMS har også blitt trukket frem som mulig årsak til flekker i filét hos atlantisk laks [2, 8, 12]. I regresjonsmodellene (univariat- og multivariabel-modellene) fra alle datasettene hadde utsettene som har registrert PD, HSMB eller CMS en trend mot høyere prevalens av melaninflekker ved slakt. I datasett 2 er utsettene hovedsakelig diagnostisert med PD, og få utsett var HSMB- eller CMS-positive. Multivariabel-modellen fra dette datasettet viser ingen effekt av PD-status på melaninprevalensen, mens håndteringsdødelighet gir høyere prevalens melaninflekker ved slakt. Siden dataene er på lokalitetsnivå og en mister variasjonen i klinisk sykdom og andre faktorer relatert til produksjon og miljø mellom merder innad i et anlegg, vil disse resultatene ha redusert statistisk styrke. Nye analyser bør derfor gjøres i datasett med data på merdnivå for å øke oppløsningen på dataene og øke den statistiske styrken til resultatene fra analysene (se kapittel 7.3 for videre diskusjon av dette punktet).

Antall unike virusdiagnoser per utsett

I univariat-modellene i datasett 2 og 3 og i multivariabel-modellene i datasett 3 ser en at antall unike virusdiagnoser i løpet av et utsett gir en trend mot å øke prevalensen av melaninflekker ved slakt. Dette tyder på at en økt infeksjonsbyrde hos fiskegruppene bidrar til å øke prevalensen av flekker. Samtidig, så viste modellene i datasett 1 en motsatt trend, at økt antall unike virusdiagnoser gir en trend mot lavere prevalens ved slakt. Denne motstridigheten kan være på grunn av forskjeller mellom datasettene i hvilke virussykdommer som diagnostiseres i de respektive områdene og frekvensen av de ulike virusdiagnosene.

Interaksjon mellom forskjellige virusdiagnoser i løpet av tiden i sjø

Figur 7 og univariat-analysene i alle datasettene viser at det er en varierende effekt på prevalensen av flekker i grupper med kun en virussykdom og de med kombinasjon av de forskjellige virusdiagnosene inkludert i dette studiet. Dette fremhever behovet for en høyere oppløsning av dataene for å kunne belyse eventuelle sammenhenger mellom type virusdiagnose og kombinasjonen av forskjellige virusdiagnoser som har størst effekt på melaninprevalensen.

Det ble også vist en forskjell i prevalens mellom utsett med og uten virusdiagnoser som i tillegg har registrert håndteringsdødelighet i datasett 2 og 3. Denne interaksjonen er ikke entydig i datasettene, men kan tyde på at i noen tilfeller kan en virussykdom i kombinasjon med håndtering påvirke prevalensen av flekker i en populasjon. Igjen vil data på merdnivå kunne klargjøre disse eventuelle sammenhengene.

Effekt av tid fra diagnose til slakt

Prevalensen av melaninflekker varierte med tid fra første diagnose av PD, HSMB eller CMS (Figur 8 og 9). Dette kan mulig reflektere variasjon i alvorlighetsgrad mellom utbruddene av de ulike sykdommene, men også være som følge av andre faktorer. Det vil derfor være helt nødvendig å ha mer detaljerte og

sammenhengende data om bl.a. dødelighet, tilvekst, temperatur og oksygen og håndtering på merdnivå for å kunne finne ut i hvilke grad tid mellom diagnose og slakt påvirker prevalensen av melaninflekker.

I regresjonsmodellene fant vi ingen signifikant effekt av tid mellom første diagnose og slakt på melaninprevalensen ved slakt. For å kunne konkludere med effekt av tid fra diagnose til slakt, må en derfor trolig ha kontinuerlige data på merdnivå som følger fisken i merdene gjennom anlegget i løpet av sjøperioden. Da vil en øke sjansen for å oppdage hvordan forskjeller i bl.a. alvorlighetsgrad og varighet til sykdomsutbruddet og appetittsvikt påvirker melaninprevalensen.

I sum tyder disse resultatene på at virussykdom påvirker prevalensen av melaninflekker i filét i atlantisk laks og støtter funn i tidligere studier. Dataene i dette studiet er for lite detaljerte til å kunne peke på ett spesifikt agens som felles risikofaktor for økt prevalens, og ytterligere studier er nødvendig for å klarlegge dette. En kan heller ikke utelukke at flere agens kan forårsake den patologiske tilstand som melaninflekker er. Diagnose av PD, HSMB og CMS er sentralt i denne studien, men vi vet ikke om populasjonene er bærere av virus uten sykdomsutbrudd. Vi må regne med at de aller fleste fiskegruppene er PRV-positive, og det kan påvirke (manglende) dokumentasjon av betydningen av HSMB/PRV. I PD-sonene må vi også ta høyde for at det er grupper som ikke har fått PD-diagnose som er SAV-infiserte.

Antall måneder i sjø

I multivariabel-regresjonsanalysen fra datasett 1 og 2 var antall måneder i sjø positivt og signifikant assosiert med melaninprevalensen ved slakt (Tabell 6 og 8), og viste en trend mot at økt antall måneder i sjø gir en økt prevalens av melaninflekker ved slakt. Erfaringer fra felt tilsier en økning i prevalensen med økt tid i sjø. Dette ble også funnet av Jimenez og medarbeidere [12]. Funnene presentert i denne rapporten samsvarer derfor funn i andre studier. Det at prevalensen av pigmentflekker tilsynelatende øker med økt tid i sjø er viktig å ta med når en vurderer andre faktorer som er påvirket av tid i sjø, som tid mellom virusdiagnose og slakt og effekten av CMS diagnose, som vanligvis diagnostiseres mot slutten av vekstfasen i sjø.

Sesong for utsett

I datasett 1 og datasett 3 var sesong for smolt-utsett i sjø signifikant assosiert med melaninprevalens. Multivariabel-modellen i datasett 1 viste at høst-utsettene har lavere prevalens av melaninflekker ved slakt i forhold til vår-utsettene (Tabell 6). Dette samsvarer med tilsvarende funn i studiet til Jimenez og medarbeidere i et datasett hentet fra Møre og Romsdal (2015) [12]. I datasett 3 viste multivariabel-modellen at høst-utsettene har høyere prevalens av flekker sammenlignet med vår-utsettene (Tabell 10). Dette er det motsatte av resultatene i datasett 1. Denne forskjellen kommer også frem i Tabell 2, og kan muligens forklares med forskjeller i andel utsett av 1.5-åringer (som settes ut på høsten) og andre produksjonsrelaterte forskjeller mellom produsentene.

Forskjeller i melaninprevalens mellom vår- og høst-utsett kan være forklart av forskjeller i infeksjonspress, miljøfaktorer som temperatur og oksygen, som igjen kan påvirke immunsvaret til fisken og forskjell i håndteringsfrekvens. Videre studier er nødvendig for å avklare disse forskjellene mellom høst- og vår-utsett.

Snittvekt ved utsett

Snittvekt ved utsett i sjø reflekterer først og fremst om det er 0-, 1- eller 1.5-åringer som settes ut på lokaliteten. Samtidig vil det være variasjon i snittvekten på fiskegruppene som settes ut på en lokalitet og mellom lokaliteter. Dette kan påvirke hvordan smolten starter i sjø etter utsett, mottakelighet for patogener og tid de forskjellige fiskegruppene bruker til å nå slaktemoden vekt. Dette kan derfor påvirke prevalensen av melaninflekker, og ble inkludert i analysen av datasett 1 og 2.

I datasett 1 viste multivariabel-modellen at en økt snittvekt ved utsett ga en svak økning i prevalensen av flekker ved slakt (Tabell 6). En svakhet ved dette resultatet er at dataene for snittvekt var på lokalitetsnivå, og data på merdnivå ville i større grad ta opp forskjeller i snittvekt mellom merder og en mulig effekt på prevalensen av flekker. I datasett 3 hadde ikke snittvekt ved utsett noen forklaringsstyrke på prevalensen av melaninflekker.

Andel utfôret systemiske helsefôr

Mørkøre og medarbeidere har tidligere beskrevet en positiv effekt på prevalensen av melaninflekker i PRV-SAV ko-infiserte fiskegrupper som ble fôret med fôr som hadde lavere fettinnhold og høyere andel protein, sammenlignet med et ordinær vekstfôr [7]. I datasett 2 inkluderte vi informasjon om mengde utfôret ordinært vekstfôr og helsefôr fisken hadde fått. Vi beregnet andel utfôret helsefôr i forhold til totalt utfôret fôr per utsett. Videre delte vi de ulike typene helsefôr inn i to kategorier, slimhinne og systemiske helsefôr, ettersom de er tilpasset ulike formål i henhold til produsentenes anbefalinger. Optimalt sett skulle data om nøyaktig innhold av bl.a. fettinnhold, innhold av marine råvarer og proteiner i fôrreseptene vært inkludert i analysen, men dette var ikke mulig å gjennomføre på grunn av tidsbegrensninger. Bruk av helsefôr vil i stor grad være påvirket av management, sykdomsstatus, miljøforhold, og vil derfor variere mellom utsett og fiskegenerasjoner. Siden grunnlaget for fôrdataene og mangel på merdnivå på dataene vil en derfor ikke kunne konkludere på bakgrunn av resultatene beskrevet i denne analysen, og ytterligere studier er nødvendig for å bekrefte dette.

Sammenhengen mellom andelen utfôret systemiske helsefôr av totalt utfôret fôr per utsett og melaninprevalensen, viser en gradvis nedgang i melaninprevalensen med økt andel systemiske helsefôr (Figur 10). I multivariabel-analysen av datasett 2 var det en sammenheng med økt andel utfôret systemiske helsefôr og redusert prevalens av melaninflekker ved slakt (Tabell 8). En økt bruk av systemiske helsefôr mellom anlegg hos samme produsent kan reflektere driftsforskjeller, «problem»-utsett eller utsett som har opplevd mer sykdom enn andre lokaliteter. Derfor kan de positive effektene av bruk av systemiske helsefôr observert i dette studiet være at vi måler en effekt av helsefôr som virker gjennom/i stedet for en ukjent underliggende faktor, som mer reelt medvirker til utviklingen av melaninflekker. Dette må derfor klargjøres videre i mer målrettede forsøk.

Generasjonen som ble satt ut i 2010 (G10) peker seg ut i datasett 2 med den laveste melaninprevalensen i hele datasettet. Et interessant funn er at G10 viste ingen effekt på prevalens av melaninflekker med økende andel systemiske helsefôr. Hvorvidt dette kan forklares med en generelt god helsestatus på denne generasjonen er spekulativt og må bekreftes i nye studier. G10 skilte seg ikke ut med spesielt lav total akkumulert dødelighet eller andre produksjonsrelaterte variabler. Prevalensen var jevnt lav blant lokalitetene som hadde bidratt med fisk til filétering i G10, med kun en lokalitet som hadde signifikant høyere prevalens sammenlignet med de andre lokaliteten på denne generasjonen.

7.3. Data på merdnivå gi høyere oppløsning

Årsaken til grad av dannelsen av melaninflekker i laksefilet er multifaktoriell, og dette betyr at et sett med risikofaktorer (defineres som tilstrekkelige faktorer) som påvirker dannelsen av melaninflekker i filét hos laks, men som også kan variere noe mellom fiskegrupper. Blant disse tilstrekkelige faktorene kan en tenke seg en nødvendig faktor (A) som alltid må være til stede for at problemet oppstår. Denne nødvendige faktoren for dannelsen av melaninflekker kan være en infeksjon av PRV eller SAV. Faktor A alene gir ingen melaninproblem og samtidig vil fravær av faktor A heller ikke gi et melaninproblem. Identifiserer vi ti tilstrekkelige faktorer kan det være slik at en kombinasjon av faktorene A + B, C og D, gir melaninflekker, eller at kombinasjonen av faktorene A + E, F og G, gir melaninproblem, osv.

Det vil også være en stor variasjon mellom fiskegrupper og utsett i bl.a. prevalens av flekker, snittvekt ved utsett, smoltkvalitet, total akkumulert dødelighet, infeksjonspress (virus, bakterier og parasitter), tilvekst, håndteringsfrekvens og abiotiske faktorer som temperatur og oksygenmetning. Viktige forskjeller internt i anlegg kan derfor forsvinne ved at en håndterer data på lokalitetsnivå, og det kan føre til at en ikke kan konkludere når en gjennomfører retrospektive studier. Derfor vil det være nødvendig å ha data på merdnivå når en skal identifisere risikofaktorer for melaninflekker i laksefilet med høyere sikkerhet og presisjon.

For å kunne bruke data på merd-nivå må en også være sikker på at informasjonsflyten er sporbar fra utsett til slakt. Dette betyr i praksis at en må ha et system som gjør at en kan følge fisken som blir satt ut i merd A til den blir slaktet fra merd Ø og Å. Dette vil styrke dataanalysene betraktelig, og er helt nødvendig for å gi pålitelige resultater fra epidemiologiske studier i akvakultur.

7.4. Fremstilling av melanindata

Den deskriptive analysen av datasettene viser at det å fremstille prevalensdata per slakteår (Figur 3A) gir et mindre nyansert bilde av de samme dataene enn når de blir fremstilt per fiskegenerasjon (Figur 3B). Dette er hovedsakelig fordi en fiskegenerasjon kan slaktes over to kalenderår. Videre er data om risikofaktorene som brukes i denne type epidemiologiske studier hentet fra produksjonsdata på generasjonsnivå. Dette gjør at melaninprevalensen som er den avhengige variabelen i analysen også må håndteres på generasjonsnivå. Denne forskjellen vil kunne være avgjørende når en skal identifisere risikofaktorer som kan forklare prevalensen av melaninflekker i oppdrettet atlantisk laks.

Det er en til dels stor variasjon i prevalens av flekker mellom generasjonene i alle datasettene. I Figur 3B er denne variasjonen i datasett 2 presentert. Når dataene håndteres på generasjonsnivå, og dermed år for smolt-utsett, må fisk som har blitt flyttet mellom sjølokaliteter i løpet av sjøperioden tas ut (her kalt «Flyttet til lok» i datasett 1 og 2). Denne gruppen har en ikke fullstendig informasjon om fra utsett i sjø. Det vil derfor være viktig å ekskludere denne gruppen fra datasettet som brukes i en regresjonsanalyse med mål om å identifisere risikofaktorer for melaninflekker. I de seinere årene har produksjonen av matfisk blitt mer og mer standardisert, og det vil være lite flytting av fisk mellom sjø-lokaliteter, men er likevel et viktig poeng å være klar over i fremtidige datasett.

7.5. Forslag til longitudinell studie av faktorer som påvirker melaninprevalensen

En longitudinell studie er en feltstudie som følger ett eller flere smolt-utsett gjennom livsløpet til slakt og registrerer data fortløpende, og tar nødvendige prøver fra studiepopulasjonen i bestemte tidsintervaller. Ved å gjennomføre en longitudinell feltstudie kan en identifisere forskjeller i hva som påvirker prevalensen av melaninflekker ved slakt. Antallet merder som inkluderes i studien er avhengig av ressursene som er tilgjengelige og av hvor komplekse problemstillinger en skal studere. Melaninflekker i laksefilet er et multifaktorielt problem, og vil derfor kreve et høyt antall merder i en studie for å sikre tilstrekkelig statistisk styrke i resultatene. En annen utfordring med å studere melaninflekker er at det på det nærmeste ikke finnes anlegg som er helt fri for flekker. Det å ha negative kontroller er svært viktig i epidemiologiske studier for å kunne skille ut viktige risikofaktorer. Siden dette vil være svært vanskelig når en studerer melaninflekker hos laks, må en forholde seg til fiskegrupper som har lite og mye innslag av flekker. Dette vil kreve et høyt antall lokaliteter for å få tilstrekkelig statistisk styrke.

Nedenfor er flere viktige punkter som bør vurderes når en skal designe en longitudinell studie:

- Produksjonsdata som registreres må være på merd-nivå som må kunne spores fra utsett til slakt.
- Individdata av melaninscore gir høyere oppløsning på dataene i en longitudinell studie, men i en generell registrering av forekomst av melaninflekker vil ikke individdata være nødvendig.
- Ved å score/registrere flekker på flere tidspunkt etter utsett, f.eks. med tre måneders intervaller etter utsett, vil en øke sannsynligheten for å plukke opp når forskjeller i prevalens oppstår mellom merder og/eller fiskegrupper. Dermed vil en lettere kunne relatere denne utviklingen til spesifikke hendelser i løpet av utsettet. Dette kan være infeksjon med virus, sykdomsutbrudd, alvorlighetsgrad til sykdomsutbruddet, håndtering i forbindelse med lusebehandling med eller uten påfølgende dødelighet, dropp i oksygennivå eller høy eller lav sjøtemperatur.
- Inkludere faktorer i tillegg til faktorene som har pekt seg ut i dette prosjektet:
 - o Forekomst av relevante virus
 - o Sjøtemperatur ved 3, 5 og 10 meters dybde
 - o Oksygenivå ved 3, 5 og 10 meters dybde og i ytterkantene av et anlegg for å ta høyde for endringer i strømbildet på lokaliteten
 - o Døgngrader

8. Konklusjon

Dette prosjektet viser at en må gjøre tiltak for å sikre at melaninprevalensen er pålitelig og representativ for målpopulasjonen som data om risikofaktorene hentes fra. Resultatene fra dette studiet viser at ulike registreringsmåter gir forskjellig fordeling av prevalensen av melaninflekker. Dette kan også påvirkes av hvilke type fisk som går til filétering. Disse punktene må rettes og standardiseres slik at en har en pålitelig registrering av prevalensen av melaninflekker som kan brukes inn i epidemiologiske analyser. Resultatene viser at er også viktig å presentere prevalensen av melaninflekker per fiskegenerasjon og ikke per kalenderår da dette gir et mer nyansert bilde av melanindataene og kan brukes direkte med produksjonsdata som samles per generasjon.

Det er til dels en stor variasjon i hvilke risikofaktorer som peker seg ut i de forskjellige datasettene. Dette forsterker mistanken om at melaninflekker hos atlantisk laks er en multifaktoriell tilstand (dvs. at en kombinasjon av risikofaktorer påvirker dannelsen av melaninflekker). Påvisning av virussykdommene PD, HSMB og CMS viser seg å ha betydning for prevalensen av melaninflekker i alle datasettene og støtter tidligere studier av felldata som har undersøkt risikofaktorer for melaninflekker hos laks. Utsett som har en, to eller tre virusdiagnoser i løpet av tiden i sjø viser en trend mot høyere prevalens av melaninflekker sammenlignet med utsett som ikke har fått diagnostisert virussykdom. Et interessant funn er den positive effekten av systemiske helsefôr på prevalensen av melaninflekker. Dette kan reflektere sykdomsbildet på lokalitetene i dette datasettet og må klargjøres videre for å kunne forklare dette. Analysene i rapporten viser også at andelen melaninflekker viser en svak økning med økt tid i sjø. Dette samsvarer med feltefaringer og funn av andre forskere.

Den statistiske styrken til analysene som er gjort i dette prosjektet ville ha økt betraktelig hvis alle data var på merdnivå. Det vil derfor være viktig at produsentene og private og offentlige laboratorier går sammen om hvordan dataene som samles inn kan kobles på merdnivå på en slik måte som sikrer en sammenhengende informasjonsrekke om fiskegrupper fra utsett i sjø og frem til slakt. Prosjektgruppen er klar over at oppdrettsselskapene samler inn store mengder data systematisk på merdnivå, men i en del tilfeller er ikke disse dataene enkle å koble mot bl.a. sykdomsdata på merdnivå og generelt brukes i epidemiologiske studier. Ved å forbedre disse punktene, vil en øke sjansen for å identifisere risikofaktorer med tilstrekkelig sikkerhet slik at produsentene kan iverksette effektfulle preventive tiltak for å redusere andelen melaninflekker i laksefilét.

9. Takk til bidragsyttere

Prosjektgruppen ønsker å takke Turid Mørkøre og Thomas Larsson på NOFIMA som har bidratt med å fremskaffe og strukturere data som ble brukt i dette prosjektet og for nyttige diskusjoner om utfordringene rundt melaninflekker i laksefilét.

Prosjektgruppen ønsker også å takke styringsgruppen i prosjektet, ved Simon Nesse Økland (Bremnes Seashore) og Øyvind Oaland (Marine Harvest), for gode og nyttige faglige diskusjoner og verdifulle innspill fra praktisk lakseoppdrett. Takk til Paul Midtlyng (NMBU-Veterinærhøyskolen), Erling Olaf Koppang (NMBU-Veterinærhøyskolen), Geir Magne Knutsen (Bremnes Seashore) og Randi Haldorsen (Marine Harvest) for nyttige faglige diskusjoner og verdifulle innspill i løpet av prosjektet.

Referanser

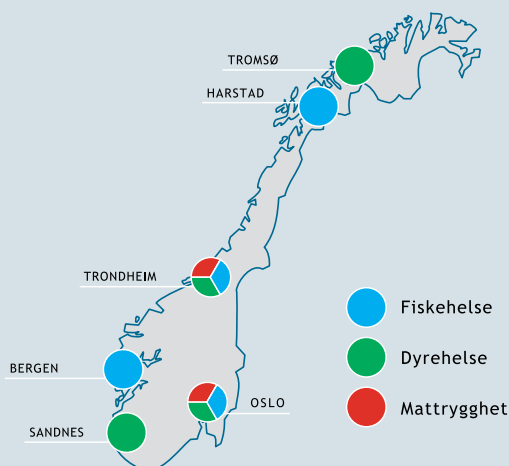
1. Färber F (2017) Melanin spots in Atlantic salmon fillets - An investigation of the general problem, the frequency and the economic implication based on an online survey.
2. Mørkøre T, Larsson T, Kvellestad AS, et al (2015) Mørke flekker i laksefilet - Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget.
3. Lillehaug A, Lunder T, Poppe TT (1992) Field testing of adjuvanted furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 15:485-496.
4. Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996) Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol* 6:335-350.
5. Larsen HAS, Austbø L, Nødtvedt A, et al (2014) The effect of vaccination, ploidy and smolt production regime on pathological melanin depositions in muscle tissue of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 37:327-340. doi: 10.1111/jfd.12106
6. Bjørgen H, Koppang EO (2017) Melanomakrofager, melanin og laks. *Nor. veterinærtidsskrift* 9:
7. Mørkøre T, Dessen J-E, Larsson T, et al (2016) Effekt av fôr på melaninflekker i laks infisert med både PRV og SAV.
8. Bjørgen H, Wessel Ø, Fjelldal PG, et al (2015) Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet Res* 46:89. doi: 10.1186/s13567-015-0244-6
9. Wessel Ø, Braaen S, Alarcon M, et al (2017) Infection with purified Piscine orthoreovirus demonstrates a causal relationship with heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon. *PLoS One* 12:1-24.
10. Kongtorp RT, Kjerstad A, Taksdal T, et al (2004) Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A new infectious disease. *J Fish Dis* 27:351-358. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00549.x
11. Palacios G, Løvoll M, Tengs T, et al (2010) Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One* 5:e11487. doi: 10.1371/journal.pone.0011487
12. Jimenez D, Hjeltnes B, Brun E (2015) Risk factors associated with occurrence of pigmented spots in salmon fillet.
13. Taksdal T, Bang Jensen B, Böckerman I, et al (2014) Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *J Fish Dis* 1-15. doi: 10.1111/jfd.12312
14. Jansen MD, Jensen BB, Brun E (2014) Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming - variations due to salmonid alphavirus subtype. *J Fish Dis* n/a-n/a. doi: 10.1111/jfd.12238

Faglig ambisjos, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute