

NEFROSMOLT

— Nefrokalsinose hos laksesmolt —

*En kartleggingsundersøkelse med fokus på
risikofaktorer*



Sluttrapport - FHF-901587

Lauris Boissonnot ¹, Christine Klykken ^{1,2}, Silje Stensby-Skjærvik ¹

¹ Aqua Kompetanse AS

² Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU)



Aqua Kompetanse
Org. nr. 982 226 163
Havbruksparken
Storlavika 7 - 7770 Flatanger
www.aqua-kompetanse.no

Tittel

NEFROSMOLT: Nefrokalsinose hos laksesmolt – en kartleggingsundersøkelse med fokus på risikofaktorer. Sluttrapport. FHF-901587.

Forfattere

Lauris Boissonnot¹, Christine Klykken^{1,2} & Silje Stensby-Skjærvik¹

¹*Aqua Kompetanse AS, 7770 Flatanger*

²*NTNU, 7034 Trondheim*

Prosjektleder

Lauris Boissonnot (lauris@aqua-kompetanse.no)

Kontaktperson

Christine Klykken (christine@aqua-kompetanse.no)

Dato

8. juli 2022

Rapportnummer Aqua Kompetanse

P554.sluttrapport.072022

Forslag til sitering

Boissonnot L., Klykken C. & Stensby-Skjærvik S. (2022) NEFROSMOLT:Nefrokalsinose hos laksesmolt – en kartleggingsundersøkelse med fokus på risikofaktorer. Sluttrapport. FHF-901587, 71 pp.

INNHold

1	Hovedfunn	7
2	Introduksjon	9
2.1	Bakgrunn	9
2.2	Prosjektorganisering	10
2.3	Målsetting	11
2.4	Næringsnytte	11
3	Kartlegging av nefrokalsinose	13
3.1	Introduksjon	13
3.2	Materiale og metoder	13
3.2.1	Biologi	13
3.2.2	Statistiske analyser	17
3.3	Resultater og diskusjon	17
3.3.1	Vurdering av nefrokalsinose	17
3.3.2	Utbredelse av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i Midt-Norge	17
3.3.3	Morfologiske og fysiologiske endringer	19
3.3.4	Generegulering	24
3.3.5	Sykdomsstatus	24
3.3.6	Sammenheng mellom nefrokalsinose og HSS	25
4	Sannsynlige årsaker til nefrokalsinose	27
4.1	Introduksjon	27
4.2	Materiale og metoder	27
4.2.1	Biologi	27
4.2.2	Miljøbetingelser	27
4.2.3	Statistiske analyser	28
4.3	Resultater og diskusjon	29
4.3.1	Effekt av vannkvalitet på utvikling av nefrokalsinose	29

4.3.2	Effekt av fôrsammensetning på utvikling av nefrokalsinose	32
5	Uttesting av tiltak i anlegg	35
5.1	Introduksjon	35
5.2	Materiale og metoder	35
5.2.1	Forsøksoppsett	35
5.2.2	Biologi	36
5.2.3	Vannkvalitet	36
5.2.4	Statistiske analyser	37
5.3	Resultater og diskusjon	37
5.3.1	Nefrokalsinose og sjøvann	37
5.3.2	HSS	42
6	Bruk av røntgen for vurdering av nefrokalsinose	45
6.1	Introduksjon	45
6.2	Materiale og metoder	46
6.3	Resultater og diskusjon	48
7	Konklusjoner og veien videre	51
8	Leveranser	53
9	Referanser	57
10	Vedlegg	63

Sammendrag

Nefrokalsinose har vært kjent som en produksjonsrelatert sykdom hos oppdrettslaks i mer enn 20 år, og beskrives som utfelling av mineraler i nyretubuli og urinlederen og/eller samlerør. I dette prosjektet har vi vist at selv om det er mulig å identifisere alvorlige grader av nefrokalsinose makroskopisk, bør man bruke histologi til å vurdere tilstanden for en mer presis diagnostikk. Bruken av røntgen ble testet i en pilotstudie, og gir interessante muligheter for å vurdere nefrokalsinose uten å måtte avlive fisken. I en kartleggingsstudie utført i settefiskanlegg i Midt-Norge og deres mottaksanlegg ble alle fiskegruppene diagnostisert med nefrokalsinose. Mens de fleste fiskene hadde milde grader av nefrokalsinose, med ubetydelige vevsskader, hadde enkelte fisk alvorlige grader av nefrokalsinose med nesten fullstendig tap av normal nyrestruktur. Nefrokalsinose var mest sannsynlig reversibel etter utsett i sjø hos fisk med milde grader, mens fisk med alvorlige grader av nefrokalsinose ikke overlevde overgangen til sjø. Uavhengig av alvorlighetsgraden av nefrokalsinose, bestod mineralkompleksene hovedsakelig amorf karbonatapatitt, et kalsiumdominert mineral. I tillegg ble et flertall av fisk med nefrokalsinose diagnostisert med hyperkalsemi (forhøyede nivåer av kalsium i blodet). Fisk med moderate og alvorlige grader av nefrokalsinose hadde også høye plasmanivåer av magnesium, glukose og aspartat aminotransferase, som mest sannsynlig var en indikasjon på forstyrret osmoregulering og økt stressnivå. En transkriptomstudie avdekket at fisk med alvorlig nefrokalsinose hadde en massiv nedregulering av metabolisme og energiproduksjon, en oppregulering av signalveier involverte i vevsreparasjon og funksjonsvedlikehold, samt en oppregulering av inflammatoriske responser. Disse resultatene indikerte tydelig at nefrokalsinose er en alvorlig velferdsutfordring hos atlantisk laks, som kan ha dramatiske konsekvenser for fiskens overlevelse.

Forskjeller i førsammensetning brukt i de ulike anleggene i kartleggingstudien var ikke korrelert med forskjellene i andel fisk med nefrokalsinose. Dette kan bety at nefrokalsinose ikke er direkte relatert til førsammensetningen. Resultatene viste heller ikke noen sammenheng mellom CO₂ konsentrasjoner i vann og utvikling av nefrokalsinose. Resultatene indikerte imidlertid tydelig at en høyere andel fisk med nefrokalsinose ble funnet i settefiskanleggene som brukte sjøvannstilsetning i sitt driftsvann. Det kan derfor være at nefrokalsinose kan være relatert til en økning i konsentrasjonen av ioner i driftsvannet. Det ble derfor gjennomført et forsøk ved et settefiskanlegg, hvor utviklingen av nefrokalsinose ble fulgt parallelt med vannkvalitet før og under tilsetning av sjøvann. En klar økning i andelen fisk med nefrokalsinose, kort tid etter tilsetning av sjøvann i karene, støttet observasjonene i kartleggingsstudien som antydte at sjøvann kan være en av faktorene som forårsaker nefrokalsinose. Settefiskanlegget tilsatte sjøvann mens fisken fikk «vintersignal» (LD12:12) som betyr at fisken fortsatt oppfattet at det var vinter og således ikke hadde begynt smoltifiseringsprosessen. Dette kan ha resultert i en mismatch i smoltifiseringssignaler, noe som førte til osmoregulatorisk stress. Fisken hadde en økning i kalsium- og magnesiumnivået i blodet etter og under tilsetning av sjøvann, som først ble regulert ned når saliniteten stabiliserte seg. Hormoner som reduserer kalsiumopptak overgjeller samtidig som de hemmer tarmens kalsiumopptak ble oppregulert hos fisk med nefrokalsinose sammenlignet med kontroll. Dette kan ha vært relatert til dannelsen av kalsiumavleiringer i nyrene, da lokal dysregulering av kalsiumhomeostase i nyrenes interstitium kan spille en nøkkelrolle i patogenesen av nefrokalsinose.

English summary

Nephrocalcinosis has been known as a production-related disease in farmed salmon for more than 20 years, and is described as an accumulation of deposits of mineral salts within kidney tubules and collecting ducts. This project highlighted that, even though it is possible to identify severe degrees of nephrocalcinosis macroscopically, histology should be used to assess the disorder for a more precise evaluation. The use of X-ray was tested in a pilot study, and offers interesting possibilities to evaluate the severity of nephrocalcinosis without having to euthanize the fish. In a survey conducted in nurseries in Mid-Norway and their receiving sea farms, all fish groups were diagnosed with nephrocalcinosis. While most of the fish had mild forms of nephrocalcinosis, exhibiting at most, negligible tissue damage, some fish affected by severe forms of nephrocalcinosis had an almost complete loss of kidney structure. The disorder seemed reversible after transfer to sea in fish with mild forms, while fish with severe forms did not survive the transfer. Regardless of the severity of nephrocalcinosis, mineral deposits were mainly found in the form of amorphous carbonate apatite, a calcium-dominated mineral. Accordingly, a majority of fish affected by nephrocalcinosis were diagnosed with hypercalcemia (elevated levels of calcium in blood). Fish affected by moderate and severe forms of nephrocalcinosis also exhibited high levels of plasma magnesium, glucose, and aspartate aminotransferase, which were most likely an indication of disturbed osmoregulation and increased stress levels. A transcriptome study revealed that fish with severe nephrocalcinosis had a massive downregulation of metabolism and energy production, an upregulation of signaling pathways involved tissue repair and function maintenance as well as an upregulation of inflammatory responses. These results clearly indicated that nephrocalcinosis is a serious welfare challenge in Atlantic salmon, which can have dramatic consequences on fish survival.

Differences in feed composition used in the different facilities was not correlated with the differences in the proportion of fish with nephrocalcinosis. This suggested that nephrocalcinosis was not directly related to the feed composition. The results neither showed a correlation between CO₂ concentrations in water and the development of nephrocalcinosis. However, they clearly indicated that a higher proportion of fish with nephrocalcinosis was found in the hatcheries that added seawater to their operational water. This suggested that nephrocalcinosis could be related to the net increase of divalent ion concentration caused by adding seawater to the operational water. A trial was therefore conducted at a nursery, where the development of nephrocalcinosis was monitored in parallel to water composition before and during the addition of seawater. A clear increase in the proportion of fish with nephrocalcinosis shortly after the addition of seawater in the tanks, supported the observations in the survey which suggested that seawater may be one of the factors causing nephrocalcinosis. The nursery added seawater while the fish were still given «winter-signal», which meant that the fish had not begun smoltification. This may have resulted in a mismatch of smoltification-signals, creating an osmoregulatory stress. Accordingly, fish exhibited an increase in calcium and magnesium levels in blood after addition of seawater, with subsequent decrease first after the salinity concentrations stabilized. Hormones that reduce calcium uptake over gills while inhibiting intestinal calcium uptake were upregulated in fish with nephrocalcinosis as compared to control. This may have been related to the formation of calcium deposits in the kidneys, as local dysregulation of calcium homeostasis in the renal interstitium may play a key role in the pathogenesis of nephrocalcinosis.

HOVEDFUNN

- Per i dag diagnostiseres nefrokalsinose best ved hjelp av histologi. Røntgen vil mest sannsynlig kunne brukes i nær framtid.
- Nefrokalsinose er en svært utbredt produksjonslidelse i Midt-Norge, med store variasjoner i prevalens og alvorlighetsgrad mellom settefiskanlegg.
- Nefrokalsinose er en alvorlig velferdsutfordring hos oppdrettslaks, som kan ha dramatiske konsekvenser for fiskens overlevelse.
- Mineralkomplekser hos laks med nefrokalsinose består hovedsakelig av amorf karbonatapatitt (amCAP), et kalsiumdominert mineral.
- Milde forandringer i nyrene ser ut til å være reversible etter utsett i sjø, mens alvorlige forandringer mest sannsynlig fører til økt dødelighet etter utsett.
- Fisk med nefrokalsinose har høye plasmanivåer i kalsium, magnesium, glukose og aspartat aminotransferase, som er en indikasjon på forstyrret osmoregulering og økt stressnivå.
- Fisk med nefrokalsinose har massiv nedregulering av metabolisme og energiproduksjon, oppregulering av vevsreparasjonsprosesser og oppregulering av inflammatoriske responser.
- Vannmiljøet til fisken ser ut til å ha stor betydning for nefrokalsinose, i motsetning til førsammensetning.
- Bruk av sjøvann for tidlig i produksjon ser ut til å føre til osmoregulatorisk stress som igjen kan gi nefrokalsinose.
- Vi fant ikke korrelasjon mellom utvikling av nefrokalsinose og CO₂-konsentrasjon i driftsvannet. Dette indikerer at nefrokalsinose kan ikke relateres kun til forøket CO₂-verdier.
- HSS er mest sannsynlig ikke knyttet til nefrokalsinose. Men, sykdommen er mest sannsynlig også relatert til osmoregulatorisk stress. HSS ser også ut til å forstyrre genregulering i gjellene.

INTRODUKSJON

2.1 Bakgrunn

Nefrokalsinose er en velkjent problemstilling, og ble første gang beskrevet hos laks (*Salmo salar*) i 1999 (Fivelstad et al., 1999). Veterinærinstituttet beskrev tilstanden første gang i sin fiskehelserapport fra 2006 (Olsen et al., 2006), og tilstanden er nevnt i alle utgitte rapporter siden. Per dags dato er omfanget av utbredelsen av nefrokalsinose ikke kjent, men basert på tilbakemeldinger fra næringen og fiskehelsepersonell kan det se ut til at omfanget har økt, til tross for mangel på systematisk registrering. Tilstanden rapporteres ofte som et tilleggssfunn ved sykdommen hemorragisk smoltsyndrom (HSS) (Hjeltnes et al., 2019), og det har derfor blitt stilt spørsmålsteget om tilstandene er knyttet sammen. Nefrokalsinose er beskrevet som utfelling av kalsium- og magnesiumsalter i urinlederen og/eller samlerør hos fisk (Bruno, 1996). Dødelighet knyttet til lidelsen er generelt lav i oppdrett, siden den ansees som reversibel (Schlotfeldt, 1981; Fivelstad et al., 1999; 2002). Tilstanden byr like vel på velferdsutfordringer for laksen, og det er sannsynlig at nedsatt nyrefunksjon svekker laksen og gjør den mer utsatt for sykdom og stress. HSS derimot induserer dramatiske fysiologiske endringer, og kjennetegnes ved anemi og omfattende blødninger i de fleste organer (Rodger & Richards, 1998; Nylund et al., 2003). I likhet med nefrokalsinose har HSS forårsaket lav dødelighet i anleggene og det er kanskje derfor det finnes svært lite vitenskapelig litteratur om sykdommen (Woo & Bruno, 2014).

Det er gjort få undersøkelser av hva mineralkompleksene består av. Så vidt vi vet finnes det ikke publiserte studier hos laks, men i en masteroppgave fra 2019 på laks og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) ble det funnet at mineralkompleksene bestod av amorf karbonatapatitt (amCAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$) og struvitt ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Thomson 2019). En undersøkelse utført av Marin Helse AS på postsmolt laks i 2017/2018, fant også amCAP, med mulig spor av whitlockitt ($\text{MgCa}_8(\text{PO}_4)_6$) (Sæther, TEKSET 2019). Blant andre marine arter er det gjort en studie på Cobia, (*Rachycentron canadum*), en abborfisk, der nyresteinene bestod av rent kalsium, oksalat og kalsiumfosfat (Klosterhoff et al., 2015). Nefrokalsinose hos regnbueørret har blitt undersøkt i flere studier. Gillespie & Evans (1979) og Bjerknes et al. (1994) konkluderte

at de bestod av kalsium, fosfor, karbonat og magnesium, mens Fikri et al. (2000) fant at de inneholdte ammoniumurat ($\text{NH}_4\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$) og kalsiumfosfat.

Det er mye som tyder på at nefrokalsinose er miljøbetinget. Det har blitt foreslått flere mulige årsaker, bla. eksponering for høye CO_2 -verdier (Smart et al., 1979; Fivelstad 2013; Fivelstad et al., 1999; 2013; 2015b; 2018; Hosfeld et al., 2008; Good et al., 2010; Khan et al., 2018), bruk av kalsiumkarbonat for å justere alkalitet og pH (Chen et al., 2001), magnesium-mangel (Knox et al., 1981), selentoksisitet (Bruno, 1996; Hicks et al., 1984), eller høy tetthet og lav vannflow (Damsgård et al., 2011). Det er også mulig at høye nivåer av fosfat er medvirkende årsak (Lewisch et al., 2013). Andre foreslåtte årsaker, som ikke er vitenskapelig testet, er hardhet, brått skifte i vannkjemi med stor tilgang på magnesium- og kalsiumioner (Bjerknes et al., 1994), smoltifiseringsstatus og endringer i ernæring.

Så vidt vi vet har ingen studie undersøkt betydningen av fôr i utviklingen av nefrokalsinose i laks. I motsetning har flere artikler rapportert at ernæring er den viktigste faktoren i utvikling av nyrestein hos pattedyr, som hund og katt (Tion et al., 2015). Ubalanse i konsentrasjoner i vitamin D, kalsium, fosfor eller aminosyrer i kosthold kan forårsake utvikling av nyrestein (Shavit et al., 2015; Phillips et al., 1986; Gambaro & Trincheri, 2016), og nyrestein kan derfor ofte behandles med fôrtilpasninger hos pattedyr (Davies, 2016). Hos regnbueørret er det rapportert at fôr med høyt innhold av fosfor og kalsium og/eller lav magnesiumkonsentrasjon kan føre til forekomst av nefrokalsinose (Heinen et al., 1993; Knox et al., 1981). Hos fisk, særlig i en aktiv vekstfase, er det behov for disse mineralene, som tilsettes i betydelige mengder i fôr. Det har ikke tidligere vært dokumentert en sammenheng mellom variasjon i fôrsammensetning hos/av ulike produsenter og batcher, og forekomsten av nefrokalsinose i settefiskfasen. Genetisk predisposisjon og hvilke mekanismer som fører til nefrokalsinose har ikke vært dokumentert hos laks. Hos pattedyr derimot ser man ofte en genetisk faktor ved utvikling av nyrestein som tyder på en metabolsk defekt (Lulich et al., 1999; Sayer et al., 2004; Vezzoli et al., 2011).

2.2 Prosjektorganisering

Prosjektet ble gjennomført av Aqua Kompetanse (prosjektleder) i tett samarbeid med NTNU. Tabell 2.1 oppgir prosjektgruppa i NEFROSMOLT som helhet, med deltagende organisasjoner, prosjektdeltakere, referansegruppa og ansvarsområder.

Tabell 2.1: Oversikt over prosjektgruppa i NEFROSMOLT, med deltagende organisasjoner og referansegruppa, prosjektdeltagere fra hver organisasjon og deres ansvarsområder/roller i prosjektet.

Firma	Involvering	Navn	Ansvar/rolle
Aqua Kompetanse	Ansvarlig organisasjon (prosjektgruppe)	Lauris Boissonnot Christine Klykken Silje Stensby-Skjærvik Liss Lunde	Prosjektleder Leder AP1, AP2 og AP4 Deltager Deltager
NTNU	Deltagende organisasjon (prosjektgruppe)	Rolf Erik Olsen	Leder AP3
Cermaq	Referansegruppe	Bendik Fyhn Terjesen	Medlem
Åkerblå (tidligere Marin Helse)	Referansegruppe	Per Anton Sæther	Medlem
Salmar	Referansegruppe	Ingrid Moan (2019-2020) Marianne Halse (2020) Ragnhild Aukan (2021-2022)	Medlem

2.3 Målsetting

NEFROSMOLT-prosjektet hadde som **hovedmål** å kartlegge nefrokalsinose hos laksesmolt med fokus om å identifisere risikofaktorer og aktuelle tiltak.

Prosjektet hadde tre delmål:

Delmål 1: Kartlegge forekomsten og alvorlighetsgraden av nefrokalsinose og HSS hos oppdrettslaks i Midt-Norge.

Delmål 2: Identifisere sannsynlige årsaker eller faktorer som spiller inn ved utvikling av nefrokalsinose og eventuelt HSS.

Delmål 3: Teste ut tiltak i anlegg med høy prevalens av nefrokalsinose med påfølgende evaluering.

2.4 Næringsnytte

Vi valgte å innlede prosjektet med en kartlegging i Midt-Norge, da det manglet systematisk dokumentasjon på hvor utbredt nefrokalsinose er. For å kunne sette inn tiltak for å redusere innslag av nefrokalsinose er man avhengig av å ha forståelse om virkningsmekanismene og risikofaktorene for tilstanden. Derfor kartla vi også vannkvalitet og førsammensetning i de samme anleggene.

Det ble gjennomført tett oppfølging av et anlegg med stort innslag av nefrokalsinose. I dette anlegget ble det avdekket en tidsskorrelasjon mellom økt andel nefrokalsinose og økt salinitet. Videre undersøkelser viste at fisken var utsatt for osmoregulatorisk stress. Osmoregulatorisk stress ser ut til å være nøkkelfaktor for utvikling av nefrokalsinose, det betyr at ved å ha en gjennomgang av drift, med fokus på varierende vannmiljø, kan anlegg avdekke tidspunkt i produksjon som er sårbar for utvikling av nefrokalsinose. Det betyr at ulike anlegg vil kunne gjøre ulike tilpasninger i eget anlegg for å redusere osmoregulatorisk stress i fiskegruppen og således motvirke utvikling av nefrokalsinose. Det er svært sannsynlig at HSS også er knyttet til

samme ubalanse i osmoregulering, og vi forventer derfor en positiv effekt på HSS dersom man kan redusere varighet og frekvens av osmoregulatorisk stress hos fiskegrupper i settefiskanlegg. Vi har i prosjektet utviklet en ny, ikke-letal metode for å diagnostisere nefrokalsinose. Røntgenteknologi viste seg å være godt egnet for nettopp å vurdere nefrokalsinose. Dette åpner for mulighet til å studere nefrokalsinose videre, uten å avlive fisken. Metoden vil bli et viktig supplement til næringen i arbeidet med fiskehelse og velferd.

KARTLEGGING AV NEFROKALSINOSE

3.1 Introduksjon

Dokumentasjon av historisk forekomsten av nefrokalsinose i norske settefiskanlegg er begrenset. Det er heller ikke gjennomført mange studier for å kartlegge årsaksforhold, samt alvorlighetsgrad av sykdommen. For å bidra til økt kunnskap på nettopp disse områdene ble det gjennomført et forsøksoppsett for enhetlig vurdering av nefrokalsinose hos smolt like før og etter sjøsetting. I forbindelse med feltforsøket ble det utarbeidet en scoringstabell for enhetlig visuell og histologisk vurdering av nefrokalsinose. Det ble videre foretatt analyser av hvilke mineraler forandringene bestod av, samt potensielle endringer i blodparametere og genuttrykk hos affisert laks.

3.2 Materiale og metoder

3.2.1 Biologi

Det ble undersøkt 360 friske laks fra 12 ulike fiskegrupper fra 11 settefiskanlegg i Midt-Norge fra oktober 2019 til august 2020 (30 fisk per uttak). Av 11 anlegg, hadde 3 RAS-teknologi, mens de øvrige var tradisjonelle gjennomstrømningsanlegg. Alle uttak ble foretatt så nært opp mot sjø-utsett som mulig, slik at fiskegruppene i størst mulig grad var smoltifisert på prøvetakingstidspunkt. Det ble undersøkt 360 friske fisk fra de samme gruppene 1 måned etter utsett i sjø. Laksen ble avlivet med en overdose bedøvelsesmiddel like etter uttak.

Vurdering av nefrokalsinose

Nefrokalsinose ble vurdert visuelt og scoret fra 0 til 4, der 0 indikerer ingen synlige utfellinger, mens ved grad 1 (mild) er samlerørene synlige (Fig. 3.1). Grad 2 (mild) og 3 (moderat) ble gitt ved noe og vesentlige mengder utfellinger. Grad 4 (alvorlig) ble gitt til individ med omfattende mengder utfellinger, samt tap av normal nyrestruktur.

For å bekrefte visuelle funn ble prøver av midt-nyre fra alle individer analysert av Pharmaq Analytiq AS etter standard histologiske metoder (Fig. 3.2). Diagnosen nefrokalsinose ble stilt



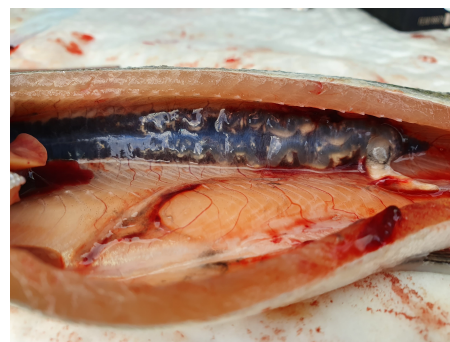
(a) Grad 1.



(b) Grad 2.



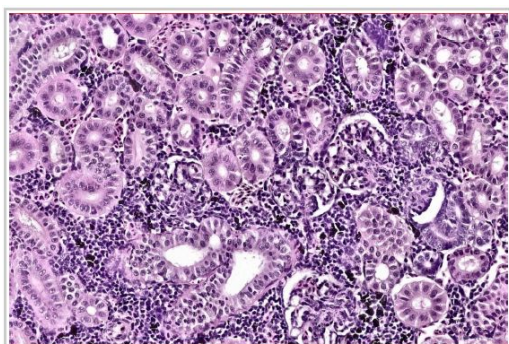
(c) Grad 3.



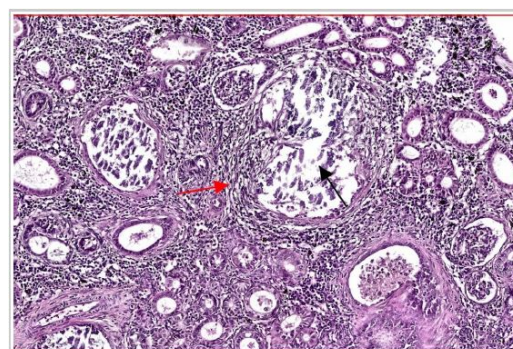
(d) Grad 4.

Figur 3.1: Visuell vurdering av ulike grader av nefrokalsinose (Fotokreditt: Aqua Kompetanse AS).

basert på funn av avleiringer i tubuli og samlerør (kategori 1). Videre ble det også vurdert skader i epitel (kategori 2), forandringer i glomeruli (kategori 3) og forandringer i hematopoetisk vev (kategori 4). Hvert individ ble gitt en samlet skår, basert på hva slags type skade som ble funnet i nyrene, der skade i kategori 3 og 4 ble vektet høyere enn skade i kategori 2 og 1. Den samlede skåren ga en av følgende graderinger: mild (skår 1-10), moderat (skår 11-20) og alvorlig (skår >20).



(a) Normalt nyre.



(b) Nyre med alvorlig grad av nefrokalsinose indikert av store mengder utfellinger (sort pil) og betennelse (rød pil).

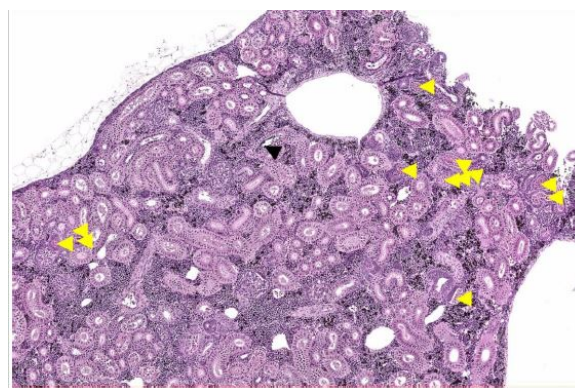
Figur 3.2: Histologisk vurdering av fisk uten og med nefrokalsinose (Fotokreditt: Anne Katrine Reed, Pharmaq Analytiq AS).

Vurdering av HSS

HSS ble diagnostisert visuelt, og bekreftet ved histologianalyser gjennomført av Pharmaq Analytiq AS. Den visuelle diagnosen ble stilt på bakgrunn av punktblødninger i muskulatur og/eller indre organ (Fig. 5.6), mens histologisk ble blødninger i tubuli og utførselsganger benyttet som en verifisering av sykdommen (Fig. 3.3b).



(a) Punktblødninger i organ (Fotokreditt: Aqua Kompetanse AS).



(b) Nyre med HSS, blødninger vist med gule piler (Fotokreditt: Anne Katrine Reed, Pharmaq Analytiq AS).

Figur 3.3: Vurdering av HSS visuelt og histologisk.

Analyse av mineralsammensetning

Det ble tatt ut prøver av mineralkomplekser som ble lagt på eppendorfrør og frosset frem til analyse (-20°C). Prøvene ble vasket i EtOH og videre sentrifugert og vasket med aceton for å fjerne lipider og vann fra prøvene. Mineralkompleksene ble undersøkt med optisk krystallografi og Fourier transform infrarød spektroskopi (FTIR) og/eller ATR (attenuated total reflection). Prøvene fra de første 4 anleggene ble analysert ved Minnesota Urolith Center, mens prøver fra de øvrige 8 anleggene ble sendt til Prof. Morten K. Moe ved Akershus universitetssykehus (AHUS) for analyse. Totalt ga 69/80 undersøkte prøver resultater.

Blodprøver

Vacuutainer-rør (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) med litiumheparin som antikoagulant ble brukt for å samle blod fra kaudalvenen, umiddelbart etter avlivning. Etter grundig vending ble prøvene sentrifugert ved 13500 rpm i 5 min (VWR Mikrostar 12, 12 x 1,5/2,0 ml) og plasmaet ble overført til Eppendorf-rør og holdt frosset (minimum -20°C) frem til analyse. Følgende parametere ble målt ved laboratoriet til Aqua Kompetanse ved bruk av en automatisert tørrkjemianalysator (CatalystOne, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME): alkalisk fosfatase (ALKP), alaninaminotransferase (ALT), aspartataminotransferase (AST), kreatinin (CREA), kalsium (Ca), natrium (Na), kalium (K), klorid (Cl), magnesium (Mg), uorganisk fosfat (PHOS), glukose (GLU), laktat (LAC) og urea. Natrium-til-kalium-forholdet (Na/K) ble også utledet. Hver av analysene benyttet egne kit utviklet for den automatiserte analysatoren (CatalystOne, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME).

Plasmaprøvene viste av og til målinger for uorganisk fosfat som oversteg deteksjonsområdet til instrumentet og sporadisk for andre parametere: i disse tilfellene ble en fysiologisk saltløsning (0,9% NaCl) brukt for å fortynne prøvene (1:4).

RNA-sekvensering

Fra de 360 individene som ble prøvetatt i kartleggingen, ble 16 individer valgt ut i henhold til kriteriene om enten å være friske (Ctrl, N=8) eller ha alvorlig grad av nefrokalsinose (NC, N=8, Fig.3.4). Vev fra nyrene ble isolert og umiddelbart overført til rør som inneholdt RNAlater ©(Life technologies, Oslo, Norge) og lagret ved 4 °C i 24 timer før lagring ved -20 °C frem til analyse. RNA-sekvensering av prøvene ble gjennomført ved Genomics Core Facility ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Bioinformatikk ble utført av Prof. Paul Whatmore ved eResearch Department ved Queensland University of Technology i Australia. For detaljert metodebeskrivelse se Løvmo et al. (2021) og Klykken et al. (2022c).



Figur 3.4: Alvorlig nefrokalsinose hos atlantisk laks - store mengder utfellinger i nyrene, med høvent vev og tap av normal struktur. (Fotokreditt: Aqua Kompetanse AS).

Patogen-screening

For å undersøke om mineralkomplekser funnet i studien kunne skyldes infeksjoner ble nyreprøver fra 13 fisk med ulike typer mineralkomplekser sendt til Pharmaq Analytiq AS for patogen-screening. Prøvene ble analysert med real-time PCR (RT-PCR), en metode som kombinerer revers transkripsjon av RNA til DNA og amplifisering av spesifikke DNA markører ved hjelp av PCR. Det ble screenet for relevante patogener hos laks: *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Pasteurella* sp., *Vibrio anguillarum* (sterotype O1 og O2A), *Yersinia ruckeri* og infeksjøs pankreas nekrose virus (IPN).

3.2.2 Statistiske analyser

Hovedandelen av statistiske analyser ble utført med R open source-programvare (R Core Team, 2019). Signifikansnivå var satt til $p < 0,05$. Normalfordistribusjon av data ble testet med Shapiro-Wilk's test. Ved normalfordistribusjon av data ble det benyttet enveis ANOVA for å undersøke signifikante forskjeller i datasettet. Student-test var utført for parvis sammenlikning av gruppene. Der data ikke var normalfordelt, ble Kruskal-Wallis test eller Wilcoxon rank sum test benyttet som et ikke-parametrisk alternativ til enveis ANOVA for å undersøke signifikante forskjeller i datasettet. Dersom Kruskal-Wallis var signifikant ble post-hoc parvis Mann-Whitney Wilcoxon test utført for å undersøke variasjoner mellom grupper.

Wald test ble benyttet for å teste signifikans av ekspresjon i RNA sekvenseringen mellom gruppene og genererte en p-verdi for hvert gen. False discovery rate (FDR) av p-verdi ble estimert med Benjamini og Hochberg metoden (Benjamini Hochberg, 1995).

Det ble utført en Multiblock PLS (partial least squares) analyse på alle miljødataene fra kartleggingen relatert til andel nefrokalsinose i hvert anlegg. I PLS-regresjon forsøker man å finne sammenhenger mellom forklaringsvariabler og en responsvariabel, ved at man antar at de er generert av en felles underliggende faktor. I multiblock PLS (MB-PLS) fordeler man forklaringsvariablene i undergrupper basert på forkunnskaper (Bras et al., 2005). Variablene ble gruppert enten under vannkvalitet eller under fôrsammensetning. Analysen ble gjennomført med Unscrambler X 11.0 (Camo Software).

3.3 Resultater og diskusjon

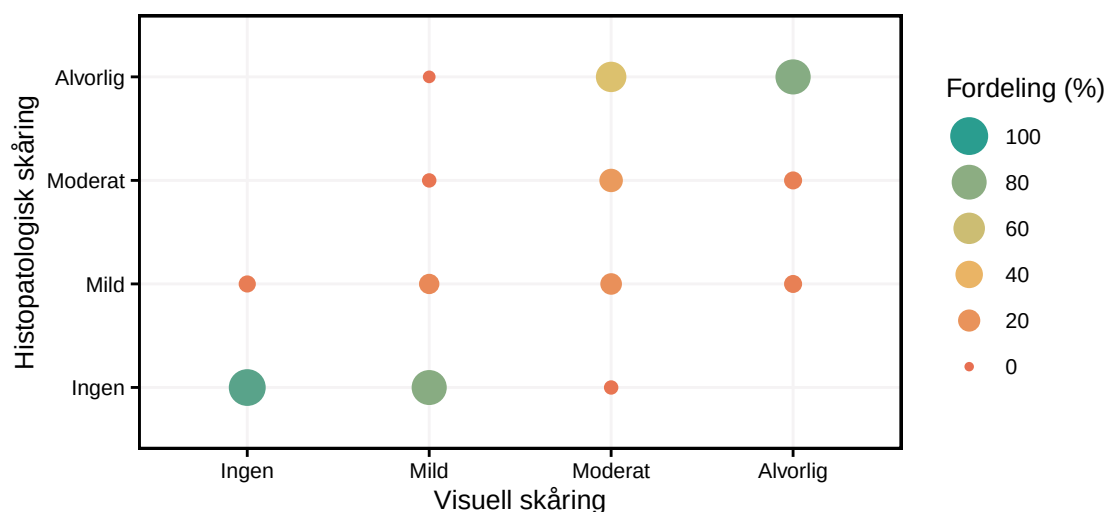
3.3.1 Vurdering av nefrokalsinose

En sammenlikning av visuell gradering og histologisk skåring viste at alvorlige former for nefrokalsinose, med store forandringer i nyrene, kan sees med det blotte øye (Fig. 3.5). Fisk uten nefrokalsinose var også relativt enkelt å se ved visuell inspeksjon, mens fisk med synlige samlerør (Grad 1) som oftes ikke ble diagnostisert med nefrokalsinose på histologi. Visuell grad 2 og 3 sammenfalt svært dårlig med histologiske funn, og ga i liten grad svar på hvor alvorlige forandringene var i nyrene. Dette tyder på at man visuelt kun kan si om fisken ikke har noen tegn til nefrokalsinose eller om de har tegn på alvorlig forandringer. Diagnose av nefrokalsinose bør stilles histologisk for alle mellomliggende grader.

3.3.2 Utbredelse av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i Midt-Norge

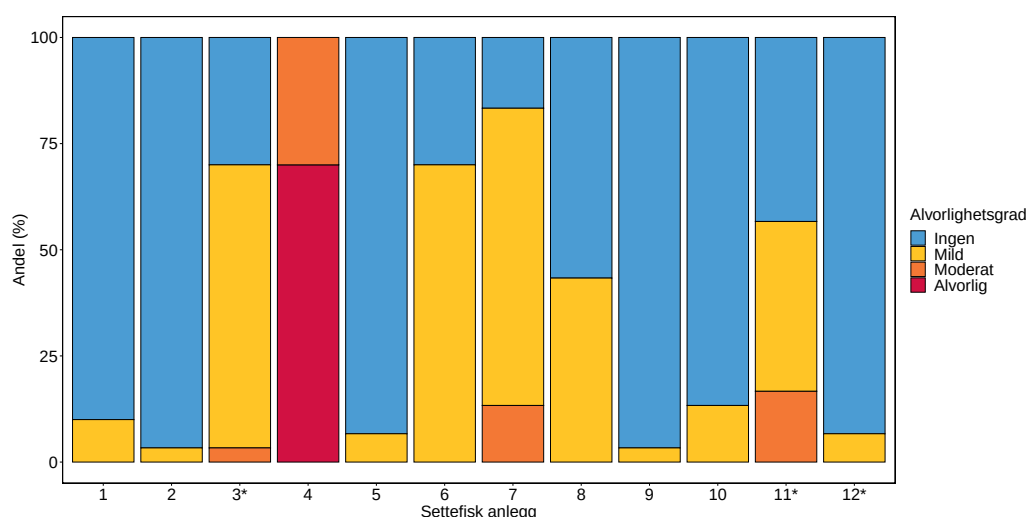
Utbredelse av nefrokalsinose i settefiskfasen

Det ble påvist nefrokalsinose i alle anlegg som ble undersøkt, men det var store variasjoner mellom anleggene (Fig. 3.6). Halvparten av anleggene hadde en stor andel fisk med nefrokalsinose ($> 50\%$), mens de øvrige anleggene hadde lite nefrokalsinose ($< 20\%$). De forskjellige anleggene hadde ulik fordeling av alvorlighetsgrad, og de fleste anleggene hadde fisk med milde forandringer i nyrene.



Figur 3.5: Visuell skåring av nefrokalsinose sammenliknet med histopatologisk vurdering. Størrelse på sirkel angir prosent vurdering som er likt ved visuell og histopatologisk vurdering.

Gjennomsnittlig ble det funnet at nesten 40% av laksesmolt i undersøkelsen fikk påvist nefrokalsinose mot slutten av produksjonssyklusen i settefiskanlegget.

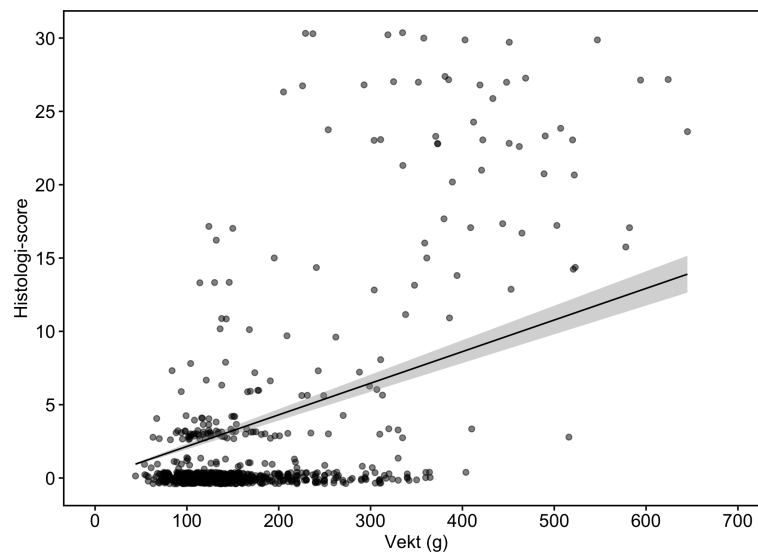


Figur 3.6: Andel fisk (%) uten og med nefrokalsinose fordelt på alvorlighetsgrad i ulike settefiskanlegg. Anleggene med RAS-teknologi er angitt med stjerne, de øvrige er gjennomstrømningsanlegg. Anleggene 3, 4, 6, 7, 8 og 11 skilte seg fra de øvrige med mer alvorlig nefrokalsinose ($p < 0,01$, se Tab. V1).

Spørsmålet om ulike produksjonsformer øker risiko for nefrokalsinose har ofte blitt stilt av næringen. Basert på funnene i kartleggingen ser det ikke ut til at dette er tilfellet (Fig. 3.6). Det ble påvist nefrokalsinose hos 44% av laksesmolt i RAS-anleggene, hovedsakelig milde former. I gjennomstrømningsanleggene ble det funnet lavere andel fisk med nefrokalsinose (33%), men til gjengjeld mer alvorlige grader.

Resultatene fra studien tyder på at større fisk (> 200 g) var mer utsatt for nefrokalsinose (Fig. 3.7). 90% av fisk som veide over 400 g hadde moderate eller alvorlige grader av nefrokalsinose. Det kan derfor se ut til at stor størrelse gir høyere risiko for å utvikle alvorlig nefrokalsinose.

Antall døgngader fra klekking til utsett i sjø ble oppgitt av majoriteten av anleggene. Basert på dataene var det ingen sammenheng mellom andel nefrokalsinose og tid i anlegget.



Figur 3.7: Nefrokalsinose-score vurdert histopatologisk mot fiskens vekt (g). Hvert punkt representerer 1 individ. Linjen angir linear regresjon med standard avvik ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,43$).

Utbredelse av nefrokalsinose etter utsett i sjø

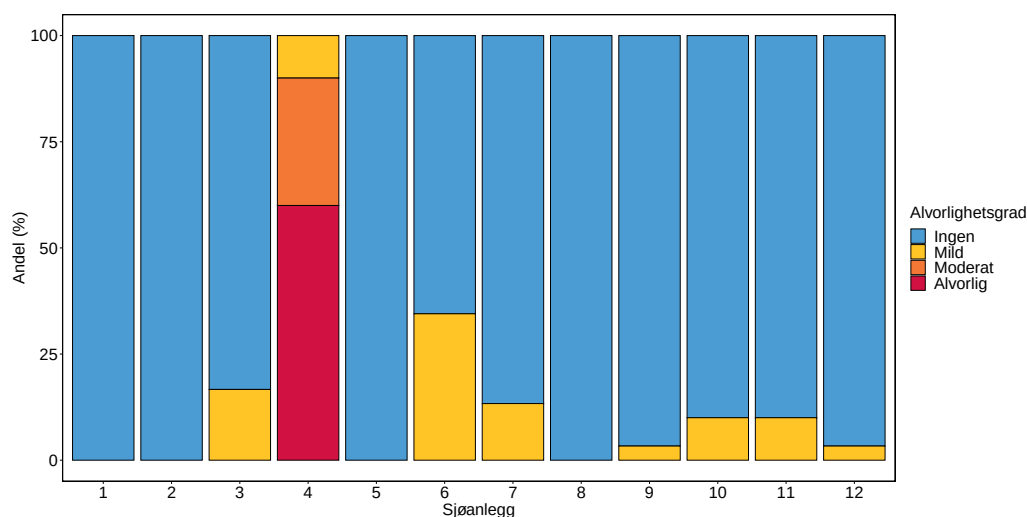
Resultatene fra studien bekrefter tilbakemeldinger fra oppdrettere om at det observeres lite eller milde grader av nefrokalsinose etter sjøutsett. Generelt var andelen fisk med nefrokalsinose redusert etter utsett i sjø (23% mot 36% i settefiskanlegget, Fig. 3.8). Av de 12 fiskegruppene som fikk påvist nefrokalsinose i settefiskfasen var det 4 som ikke fikk påvist nefrokalsinose etter utsett i sjø. Det var også en reduksjon i fisk med milde og moderate grader av nefrokalsinose (10% mot 30% i settefiskfasen). Derimot ble det funnet like stor andel med alvorlige grader i sjø som i settefiskanleggene. Disse resultatene tyder på at små forandringer i nyrene trolig er reversible mens alvorlige skader på nyret ikke vil heles. For å underbygge påstanden om at små forandringene er reversible bør død fisk like etter utsett obduseres og nefrokalsinose vurderes.

Det ble funnet forøket dødelighet etter 1 mnd i sjø ($>1,5\%$ ihht mattilsynets retningslinjer) i 3 anlegg i undersøkelsen (Fig. 3.9). Av disse 3 anleggene oppga fiskehelserapportene nefrokalsinose som dødelighetsårsak kun ved 1 anlegg (anlegg 4). Dette var anlegget som mottok størst andel fisk med alvorlig nefrokalsinose fra settefiskanlegget. Funnene støtter antagelsen om at svært alvorlige forandringer i nyrene gir utfordringer ved overgang til sjøfasen, og kan resultere i økt dødelighet på sjø.

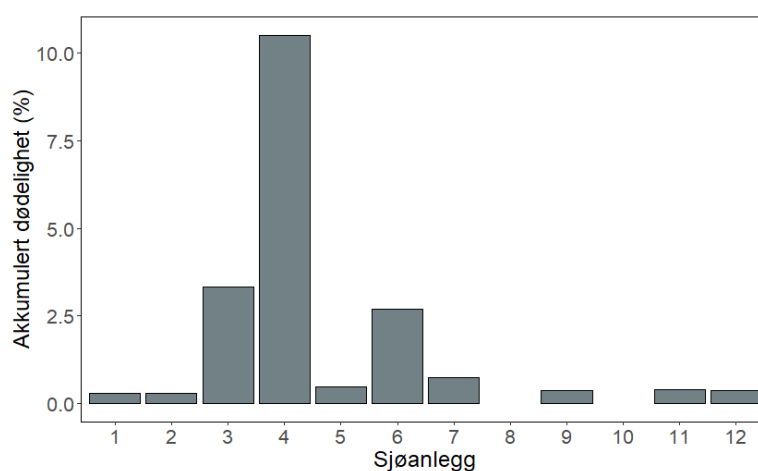
3.3.3 Morfologiske og fysiologiske endringer

Nyreforandringer

Alle individer diagnostiserte med nefrokalsinose hadde utfellinger av mineraler i nyrene. De fleste (87%) hadde også skader på vev (kategori 2) i nyrene, mens omlag 30% også hadde forandringer som påvirker nyrenes evne til filtrering (kategori 3). 34% hadde i tillegg forandringer



Figur 3.8: Andel fisk (%) uten og med nefrokalsinose fordelt på alvorlighetsgrad i ulike mottaksanlegg (sjøanlegg). Anlegg 4 skilte seg tydelig fra de andre anlegge med høyere alvorlighetsgrad av nefrokalsinose ($p < 0,001$, se Tab. V2).



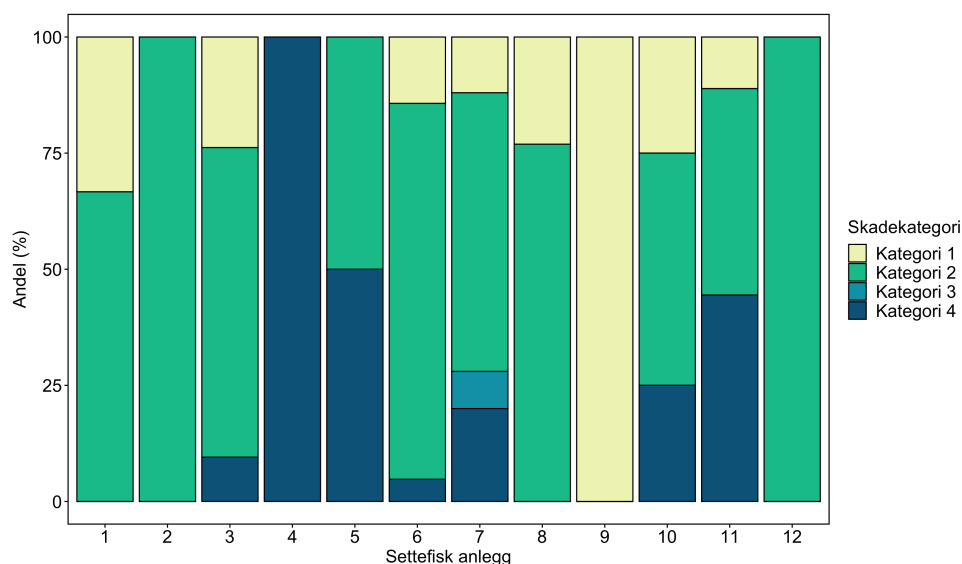
Figur 3.9: Akkumulert dødelighet (%) etter 1 måned i sjø for de 12 mottaksanleggene.

i det bloddannende vevet i nyrene (kategori 4) (Fig. 3.10). Anlegg 9 skilte seg ut der fisken med nefrokalsinose kun hadde utfellinger i nyrene (kategori 1). I andre enden av skalene var anlegg 4 der alle fiskene med nefrokalsinose hadde både skader i tubuli og samlerør, samt endringer i filtrasjonsevne og i det bloddannende vevet.

Resultatene kan bety at utfelling av mineraler i nyrene raskt fører til skade på omkringliggende vev. Slik vevsskade i nyrene påvirker sannsynligvis nyrefunksjonen og medfører derfor nedsatt velferd hos fisken.

Mineralsammensetning

Amorf karbonatapatitt (amCAP) ble funnet i 98,6% av mineralkompleksene (Tab. 3.1). De fleste mineralkompleksene bestod kun av amCAP (60,9%), men enkelte mineralkomplekser bestod av både amCAP og andre mineralkompleks (newberyitt: 8,7%, wihtlockitt: 7,2%, brushitt: 7,2%, struvitt: 4,3%, brushitt og wihtlockitt: 2,9%, struvitt og wihtlockitt: 2,9%, struvitt og



Figur 3.10: Andel fisk med nefrokalsinose (%) fordelt på skadekategori. En fisk kan ha flere skadekategorier, men representeres av den mest alvorlige kategorien registrert på histopatologi. Kategori 1: Utfelling i nyrene; Kategori 2: Vevsskade; Kategori 3: Forandringer i filtreringsevne; Kategori 4: Forandringer i bloddannende vev. Anleggene 4 og 5 skilte seg fra de øvrige med mer alvorlig skadekategorier ($p < 0,001$, se Tab. V3).

newberyitt: 1,4%).

Tabell 3.1: Mineralkomplekser funnet i fisken med nefrokalsinose ($n = 69$).

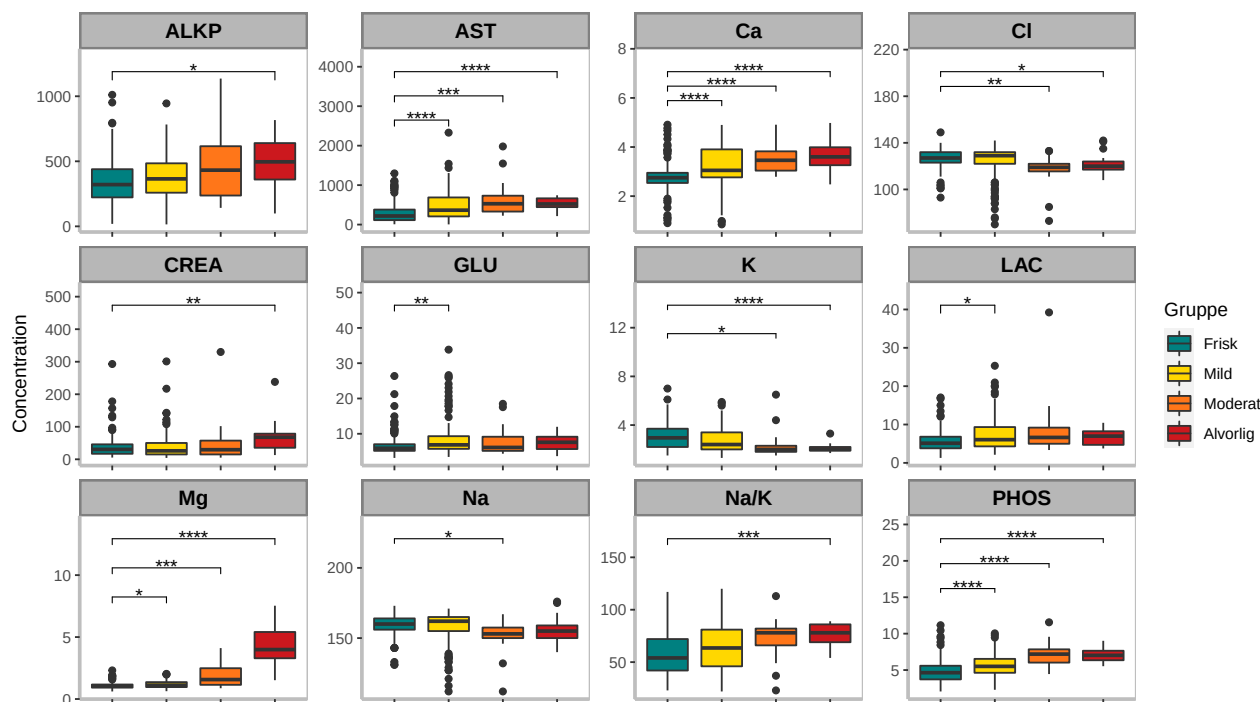
Navn	Formel	Andel prøver
Amorf karbonatapatitt (amCAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	98,6%
Whitlockitt	$\text{MgCa}_8(\text{PO}_4)_6$	14,5%
Newberyitt	$\text{MgHPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	11,6%
Brushitt	$\text{CaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10,1%
Struvitt	$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	8,7%
Karbonatapatitt (CAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	2,9%

Amorf karbonatapatitt er en nyrestein som tyder på en rask utfelling. Hos mennesker ser man sjelden steiner med $>30\%$ amCAP, og da har pasientene i tillegg nesten uten unntak struvitt, som indikerer bakteriell infeksjon (pers. komm. Prof. M.K. Moe). Dannelsen av karbonatapatitt (CAP) begynner ved $\text{pH} \geq 6,8$, med økende evne til å aggregere med økende pH (Olszynski et al., 2015). pH i urinen ble ikke målt i denne studien, men Roy og Lall (2004) fastslo at normale verdier for pH i urin hos atlantisk laks er rundt 7,5. Tatt i betraktning at amCAP og CAP har lignende kjemiske egenskaper, kan den normalt høye pH i urin hos laks gjøre den disponert for kalsiumfosfatutfelling. Dette ble ikke undersøkt i vårt prosjekt og bør studeres nærmere.

Blodkjemi hos fisk med nefrokalsinose

Smolt med nefrokalsinose hadde høyere nivå av flere enzymer og enkelte ioner, samt metabolitter som glukose og laktat sammenliknet med friske fisk (Fig.3.11). Fisk med alvorlig nefrokalsinose hadde også signifikant lavere nivåer av natrium og klorid sammenliknet med frisk fisk.

Basert på våre data, kan det se ut til at nefrokalsinose hos laks kan relateres til hyperkalsemi ettersom det ble observert hos 37% av laks med nefrokalsinose, og gjennomsnittlige plasmakonsentrasjoner av Ca^{2+} var signifikant høyere hos laks med nefrokalsinose sammenlignet med frisk fisk. I tillegg økte andelen fisk med hyperkalsemi med økende alvorlighetsgrad av nefrokalsinose. Det er ikke mulig å fastslå om den observerte hyperkalsemien er en årsak til utvikling av nefrokalsinose eller en konsekvens av nefrokalsinose basert på våre data, og dette bør derfor undersøkes nærmere.



Figur 3.11: Plasmakjemiparametere hos atlantisk laks med ulik alvorlighetsgrad av nefrokalsinose (mild, moderat og alvorlig) sammenliknet med frisk fisk. Signifikante forskjeller er angitt med */**/**/****. Målte parametere: Alkalisk fosfatase (ALKP, U/L), Aspartat aminotransferase (AST, U/L), Kalsium (Ca, mmol/L), Klorid (Cl, mmol/L), Kreatinin (CREA, $\mu\text{mol/L}$), Glukose (GLU, mmol/L), Kalium (K, mmol/L), Laktat (LAC, mmol/L), Magnesium (Mg, mmol/L), Natrium (Na, mmol/L), Na/K-ratio og Uorganisk fosfat (PHOS, mmol/L).

Blodkjemiresultatene viser at nefrokalsinose er et velferdsproblem. Forhøyede nivåer av AST, som ble observert hos fisk med mild nefrokalsinose, indikerer vevsskade (Peres et al., 2015), mens forhøyet plasmakalsium og fosfat peker på en forstyrret regulering av ionebalansen i kroppen (Vielma&Lall, 1998). Forhøyede plasmaglukose- og laktatnivåer er knyttet til sekundære stressresponser hos laks (Iversen & Eliassen, 2009).

Fisk som hadde moderate og alvorlige former for nefrokalsinose hadde fire ganger så høye konsentrasjoner av magnesium i plasma sammenlignet med frisk fisk. Den affiserte fisken ble diagnostisert med alvorlige forandringer i nyrene, også beskrevet som patologiske forandringer i glomeruli og interstitielt vev med omfattende epitelskade i tubuli. Det primære stedet for magnesiumutskillelse i fisk er nyrene (Bijvelds et al., 1998) og forhøyet konsentrasjon av plasmamagnesium har tidligere blitt knyttet til nyreskade (Nieves et al., 2007). Fisk med alvorlige former for nefrokalsinose viste også forhøyede plasmanivåer av AST, noe som igjen indikerer

vevsskade, samt betydelig lavere konsentrasjoner av kalium, natrium og klorid, som anses som tegn på redusert osmoregulatorisk kapasitet (Carey& McCormic, 1998).

Referanseintervall for blodkjemiparametere hos atlantisk laks

Det foreligger i dag svært lite data på normalverdier for blodkjemi hos laks. Vi valgte derfor å utarbeide forslag til intervaller basert på de friske fiskene i vårt datamateriale. Referanseintervallet for normalverdier av plasmakjemiparametere ble konstruert ved å inkludere all fisk uten nefrokalsinose ($n = 234$) og ekskludere fisk med HSS (Haemorragisk smolttsyndrom, $n = 5$), for å sikre at kun frisk fisk ble inkludert i datasettet ($n = 229$). Metoden benyttet for å konstruere referanseintervallet er beskrevet i Friedrich et al. (2012).

Tabell 3.2: Normale intervaller for utvalgte plasma kjemi parametere fra 229 friske laks.

Parameter	Normal intervall
ALKP(U/L)	66 - 667
ALT (U/L)	10 - 38
AST (U/L)	22 - 729
Kreatinin (U/L)	9 - 80
Kalsium (mmol/L)	2.1 - 3.4
Magnesium (mmol/L)	0.7 - 1.5
Uorg. fosfat (mmol/L)	2.4 - 8.1
Natrium (mmol/L)	149 - 169
Kalium (mmol/L)	1.5 - 4.9
Na/K	30 - 103
Klorid(mmol/L)	113 - 137
Osmolalitet (mmol/kg)	305 - 343
Glukose (mmol/L)	3.7 - 8.7
Laktat (mmol/L)	2.1 - 10.1
Blod urea nitrogen (mmol/L)	0.6 - 1.7

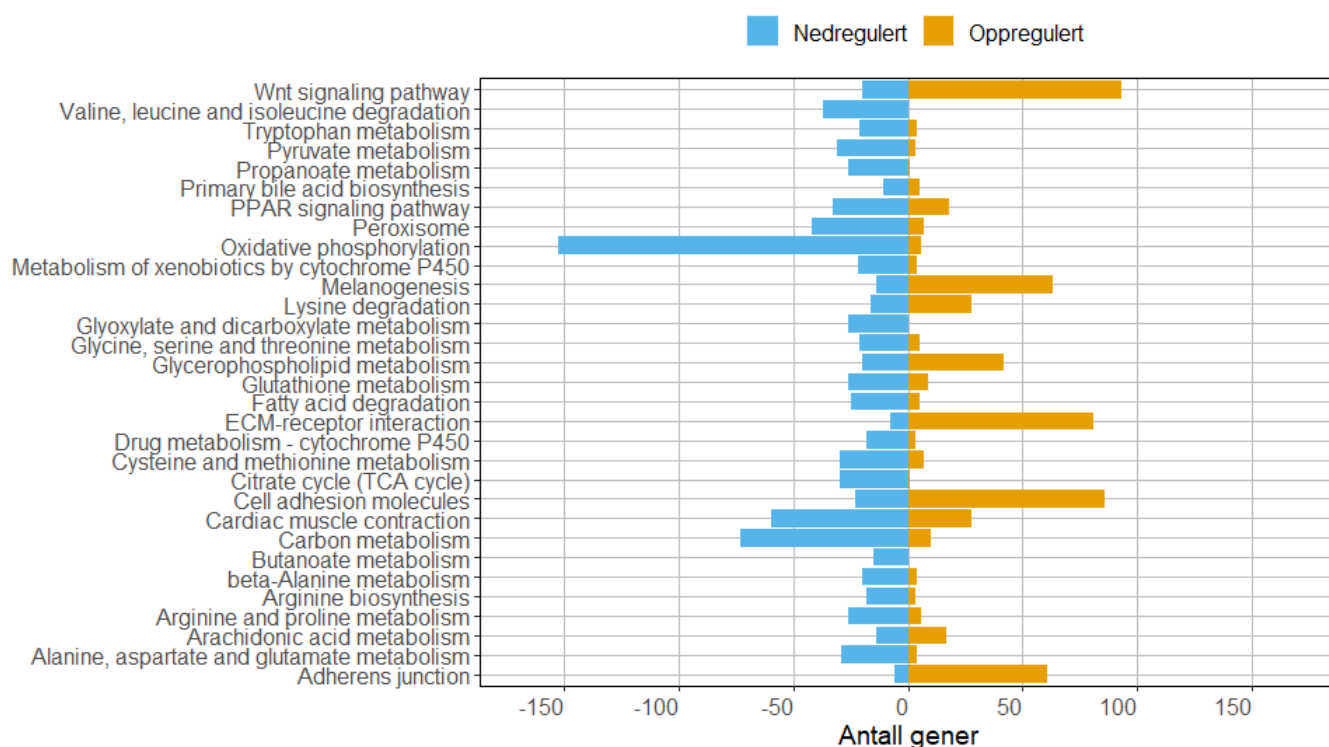
Våre resultater var av samme størrelsesorden som tidligere rapporterte verdier for blodkjemi hos laks, men de normale intervallene etablert i denne studien var bredere enn referanseverdier tidligere rapportert av Sandnes (1988) for 10-20 voksne atlantisk laks fra en enkelt havbruk i Norge (Sandnes, 1988). En forklaring kan være at våre data inkluderte et større antall prøver samt flere anlegg. Matsche et al. (2014) fant statistiske forskjeller i plasmakjemiparametere hos atlantisk stør (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) fra forskjellige produksjonsforhold. Variasjonene i vannkjemi og fôr mellom settefiskanleggene i vår studie kan derfor ha påvirket plasmakjemien. Det bredere intervallet av plasmaparametrene kan alternativt knyttes til prøvetakingstidspunktet som falt sammen med slutten av parr-smolt-transformasjonen (3905 ± 537 daggrader fra rogn til prøvetakingstidspunkt). Parr-smolt-transformasjon er en kompleks prosess som resulterer i en endret fysiologi hos laksen (Folmar & Dickhoff, 1980), og vil neppe være 100% synkronisert i en populasjon, noe som forårsaker ulik fysiologi blant de prøvetatte fiskene. Vi mener derfor at referanseintervallene vi foreslår er relevante for atlantisk laks som gjennomgår smoltifisering (60 - 210 g) i settefiskanlegg med miljøforhold i henhold til norsk regelverk.

3.3.4 Generegulering

Totalt 10 133 gener var enten oppregulert eller nedregulert hos fisk med alvorlig nefrokalsinose (NC) sammenliknet med frisk fisk (Ctrl).

En stor andel av de nedregulerte genene var knyttet til metabolisme og energiproduksjon (Fig.3.12). Dette kan bety at alvorlig nefrokalsinose fører til en funksjonsfeil i nyrene med redusert kapasitet for vedlikehold og reparasjon. Dette er ikke usannsynlig med tanke på at alvorlig nefrokalsinose innebærer omfattende vevsskader inkluderte endringer i glomeruli og det bloddannende vevet. Disse omfattende vevsskadene er også trolig årsaken til at det var en betydelig andel av de oppregulerte genene som var knyttet til reparasjons- og rekrutteringsprosesser, i et forsøk på å opprettholde vevsstruktur og funksjon.

Det ble observert betydelig granulomatøs betennelse med dannelse av kjempeceller i NC-gruppen, en naturlig respons på celledskade og vedvarende irritanter. På genregulerings-nivå var dette tydelig gjennom oppregulering av inflammatoriske reparasjonsprosesser, med økt uttrykk av immuncellemarkører. Det var i all hovedsak det uspesifikke immunsystemet som var involvert.



Figur 3.12: Speilet søylediagram av antall oppregulerte (gul) og nedregulerte (blå) gener i hver signifikant KEGG-pathway hos fisk med nefrokalsinose sammenliknet med fisk uten nefrokalsinose. X-aksen er antall oppregulerte og nedregulerte gener.

3.3.5 Sykdomsstatus

For å vurdere sykdomsstatus i kartleggingsperioden ble fiskehelserapportene fra de ulike settefiskanleggene gjort tilgjengelig. Rapportene viste at fisken var frisk uten kjent sykdom. Nefro-

kalsinose var diagnostisert hos enkelte av anleggene.

Hos pattedyr kan nyreforkalkninger skyldes bakterielle infeksjoner. For å undersøke om dette kan være tilfelle hos fisk ble nyreprøver fra 13 fisk med ulike typer mineralkomplekser analysert med qPCR for de mest vanlige patogenene funnet hos laks (*Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Pasteurella* sp., *Vibrio anguillarum* (sterotype O1 og O2A) og *Yersinia ruckeri*). Prøvene var negative for alle undersøkte bakterier. Dette, sammen med hvilke type nyresteinskomplekser vi fant hos fisken indikerer at nefrokalsinose hos laks ikke skyldes tilstedeværelse av disse patogenene i nyrene.

I screeninganalysen ble også IPN undersøkt. Analysen ga positivt resultat i 7 av de 13 undersøkte fiskene ($C_t = 32,9 \pm 1,1$). Det ble påvist lave viruskonsentrasjoner, og det ble ikke gjort kliniske funn som indikerte IPN. Sykdommen har forårsaket store tap i norske settefiskanlegg i flere tiår, men det har vært en klar nedgang i forekomst av tilfeller de siste årene. Den avgjørende årsaken til dette er en kombinasjon av innføringen av rogn som er selektert for resistens mot viruset (QTL-IPN) og vaksinerings. Fisken undersøkt i denne studien var vaksinert flere måneder før prøveuttaket. Det er derfor lite sannsynlig at påvist IPN var knyttet til vaksinerings.

3.3.6 Sammenheng mellom nefrokalsinose og HSS

Det har tidligere blitt foreslått en kobling mellom HSS og nefrokalsinose, da tilstandene ofte rapporteres sammen. I denne kartleggingen ble det kun funnet 8 individ med HSS, av disse hadde 1 fisk både HSS og nefrokalsinose. Derimot ble det funnet over 100 fisk med nefrokalsinose som ikke hadde HSS. Anleggene rapporterte om noe dødelighet pga. HSS, men disse ble altså ikke fanget opp av *NEFROSMOLT*-prosjektet. Dette kan komme av at fisk med HSS raskt blir svekket og syk, og dermed ikke ble tatt ut blant de tilfeldig friske individene som ble prøvetatt i prosjektet. Basert på de få individene med HSS, men til gjengjeld mange individene med nefrokalsinose, kan det konkluderes at laks kan få nefrokalsinose uten å ha tegn til HSS først.

SANNSYNLIGE ÅRSAKER TIL NEFROKALSINOSE

4.1 Introduksjon

Tidligere studier har foreslått at nefrokalsinose hos oppdrettslaks er en produksjonslidelse som er knyttet til eksterne faktorer, og særlig vannkvalitet. Det er imidlertid uenigheter om hvilke miljøparametere som forårsaker tilstanden. Parameterne som har blitt foreslått er forhøyede nivå av CO₂ (f.eks. Fivelstad et al., 2018; Hosfeld et al., 2008; Good et al., 2010; Khan et al., 2018), bruk av kalsiumkarbonat som buffer (Chen et al., 2001) og kombinasjonen av høy fosfat og høy pH i vannet (Lewisch et al., 2013). For høy tetthet og lav vannflow har også blitt påpekt som årsaker til nefrokalsinose (Damsgård et al., 2011).

Det finnes ikke ennå studier som har undersøkt betydningen av fôr i utviklingen av nefrokalsinose hos oppdrettslaks, selv om det hos regnbueørret er rapportert at fôr med høyt innhold av fosfor og kalsium og/eller lav magnesiumkonsentrasjon kan føre til nefrokalsinose (Heinen et al., 1993; Knox et al., 1981). I vår studie gjennomførte vi derfor en multivariat statistisk analyse av en rekke vannkvalitet- og fôrparametere relatert til nefrokalsinose-prevalens.

4.2 Materiale og metoder

4.2.1 Biologi

Forekomst og alvorlighetsgrad av nefrokalsinose ble vurdert som beskrevet i kap.3.2.1. Resultatene som ble beskrevet i kap. 3.3.3 ble benyttet for å undersøke i hvilken grad nefrokalsinose var knyttet til ulike vannkvaliteter og fôrsammensetninger.

4.2.2 Miljøbetingelser

Vannkvalitet

På hvert besøk hos settefiskanleggene ble det tatt vannprøver i triplikater, fra det samme karet som det ble tatt ut fisk. Det ble foretatt målinger i triplikater av CO₂, O₂ og pH på stedet med egnede målere (Oxyguard CO₂/Hache multimeter). Vannprøvene ble videre analysert med spektrofotometri på stedet eller på Aqua Kompetanse sin lab etter transport i kjølebag. Analysene ble gjennomført med et bærbart spektrofotometer (PHotoFlex). Følgende parametere ble målt ved alle anlegg: pH, temperatur, gasser, alkalitet, konduktivitet/salinitet, salter og metaller. Deteksjonsgrensene til de ulike parameterne er listet opp i Tab. 4.1. Når det var nødvendig ble prøvene fortynnet slik at konsentrasjoner i de ulike parametere lå innenfor instrumentets måleområde.

Parameter	Min. deteksjonsgrense	Maks. deteksjonsgrense
CO ₂	0,0	50,0
O ₂	0,1	20,0
Ca	5,0	160,0
K	4,0	9900,0
Mg	5,0	75,0
Na	2,0	9900,0
PO ₄	0,02	1,6
SO ₄	2,0	70,0
Al	0,002	0,25
Cu	0,04	5,0
Fe	0,05	1,5

Tabell 4.1: Deteksjonsgrenser (mg L⁻¹) til ulike parametere målet i vannet ved kartleggingen i settefiskanlegg.

Fôrsammentsetning

Fôrprøver ble samlet på hvert settefiskanlegg og frosset (-20°C) inntil videre analyser. Analysene ble gjennomført av Sintef Norlab AS og Eurofins Food & Feed Testing Norway AS. Konsentrasjoner av kalsium, fosfat, natrium, klorid, jern og magnesium ble analysert ved induktivt koblet plasma massespektrometri (ICP-MS). Konsentrasjoner av totalprotein, totalfett, aske og karbohydrater ble analysert ved NMKL 6, NMKL173 og laboratorienes egne interne metoder.

Tilleggsanalyser ble gjennomført på de samme prøvene av Eurofins Food & Feed Testing Norway AS med gass kromatografi (GC) eller ione kromatografi med UV deteksjon (IC-UV) for å estimere innhold av ulike amino- og fettsyrer.

4.2.3 Statistiske analyser

Hovedandelen av statistiske analyser ble utført med R open source-programvare (R Core Team, 2019). Signifikansnivå var satt til $p < 0,05$. Normalfordistribusjon av data ble testet med Shapiro-Wilk's test. Ved normalfordistribusjon av data ble det benyttet enveis ANOVA for å undersøke signifikante forskjeller i datasettet. Student-test var utført for parvis sammenlikning av gruppene. Der data ikke var normalfordelt, ble Kruskal-Wallis test benyttet som et ikke-parametrisk alternativ til enveis ANOVA for å undersøke signifikante forskjeller i datasettet. Dersom Kruskal-

Wallis var signifikant ble post-hoc parvis Mann-Whitney Wilcoxon test utført for å undersøke variasjoner mellom grupper.

Det ble utført en Multiblock PLS (partial least squares) analyse på alle miljødataene fra kartleggingen relatert til andel nefrokalsinose i hvert anlegg. I PLS-regresjon forsøker man å finne sammenhenger mellom forklaringsvariabler og en responsvariabel, ved at man antar at de er generert av en felles underliggende faktor. I multiblock PLS (MB-PLS) fordeler man forklaringsvariablene i undergrupper basert på forkunnskaper (Bras et al., 2005). Variablene ble gruppert enten under vannkvalitet eller under førsammensetning. Analysen ble gjennomført med Unscrambler X 11.0 (Camo Software).

4.3 Resultater og diskusjon

Data fra vannkvalitet og førsammensetning, samt resultater fra histologi, ble så lagt inn i en datamatrise som ble behandlet statistisk med en multiblock PLS analyse, for å se hvilke parametere som hadde høyest bidrag til nefrokalsinose. Vannkvalitet viste seg å være den mest betydelige faktoren knyttet til nefrokalsinose. Anleggene som hadde en stor andel fisk med nefrokalsinose hadde til felles at de hadde høyere konsentrasjoner av sulfat i vannet (Fig.4.1). Konsentrasjonen av sulfat kan forklares med tilsetning av sjøvann (se kapittel 4.3.1).

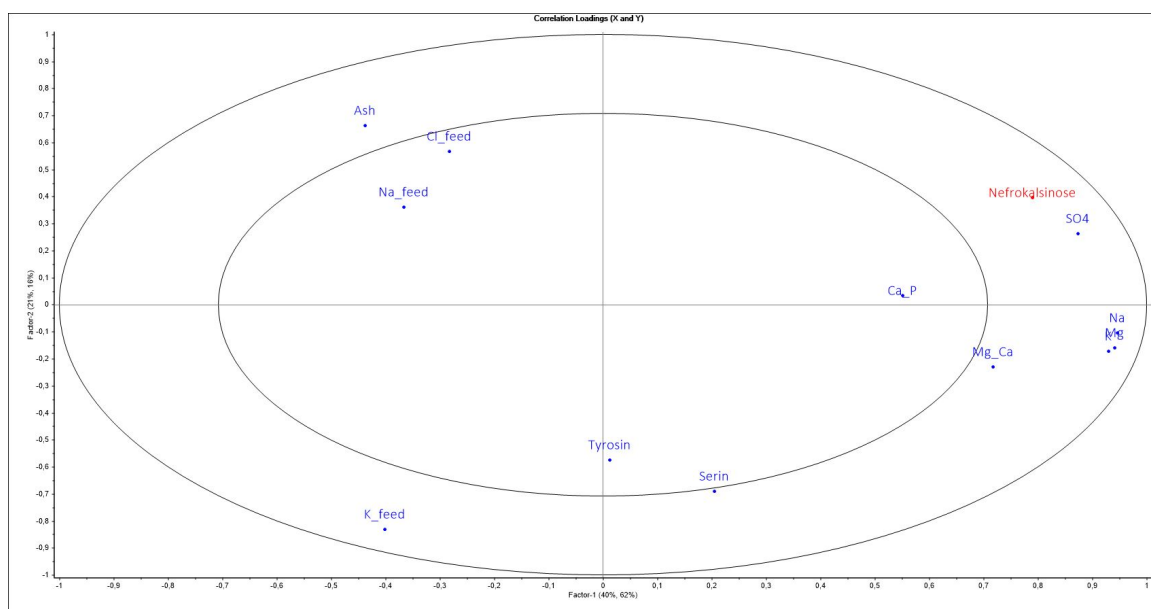
Akvatiske arter som laks skiller seg vesentlig fra terrestriske pattedyr når det gjelder eksponering for miljøet. I motsetning til pattedyr som først og fremst eksponeres for miljøet gjennom mat og drikke (noe hud), er laksen hovedsakelig eksponert for miljøet gjennom gjellene (noe hud, og i mindre grad opptak i tarm i ferskvann). Dette gjør at suboptimale vannforhold kan få stor betydning for fysiologien til fisken.

Damsgård et al. (2011) foreslo at høy tetthet og lav flow kunne være betydelig for utvikling av nefrokalsinose. Resultatene av *NEFROSMOLT*-prosjektet viste ingen korrelasjon mellom disse 2 parameterne og utvikling av nefrokalsinose hos fisken ($p > 0,005$, $R^2 < 0,3$).

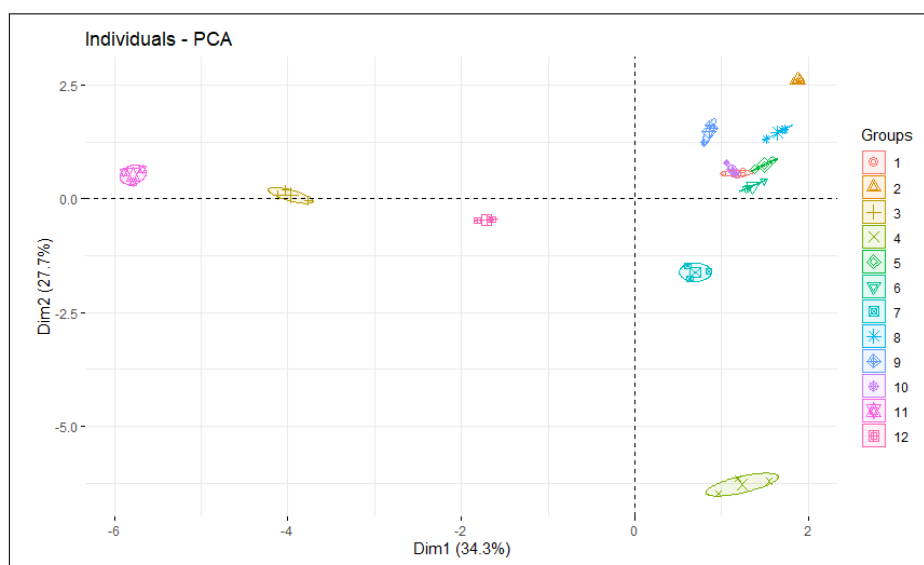
4.3.1 Effekt av vannkvalitet på utvikling av nefrokalsinose

I alle settefiskanleggene som ble kartlagt i denne studien var temperatur, pH og konsentrasjoner av gasser, ioner og metaller innenfor grenseverdier som er anbefalt av Noble et al. (2018) (Fig.V1 - V4). Det var en tydelig forskjell i vannkvalitet mellom anleggene i undersøkelsen (Fig. 4.2). De 3 RAS-anleggene (3, 11 og 12) hadde mer lik vannkvalitet, og skilte seg fra gjennomstrømningsanleggene på verdier for N-forbindelser, fosfat og temperatur. Gjennomstrømningsanleggene hadde relativt lik vannkvalitet, med typisk ionefattig vann, med unntak av anleggene som buffret med sjøvann eller salt. Det var stor forskjell i salinitet i anleggene som tilsatte sjøvann/salt (Tab. 4.2) og dette førte til forskjeller i ioner som er typiske i sjøvann (Cl, Na, SO_4 , Mg, Ca, K, Fig. V3).

En høyere andel fisk med nefrokalsinose ble funnet i settefiskanleggene som tilsatte sjøvann (anleggene 3, 4, 6, 7 og 11). I tillegg økte både andel fisk med nefrokalsinose og alvorlighetsgrad av nefrokalsinose med økende salinitet (Fig. 4.3). I anlegg som ikke benyttet sjøvann ble det



Figur 4.1: Correlation-loading plot som viser forholdet mellom miljøvariablene og responsvariabelen (nefro-kalsinose). Modellen var utledet fra 85 variabler, og med dimensjonsreduksjon ga 12 variabler best modell og validering for datasettet. Variabler for førsammensetning var aske (Ash), klorid (Cl_feed), natrium (Na_feed), kalium (K_feed), tyrosin og serin. Variabler for vannkvalitet var sulfat (SO₄), natrium (Na), magnesium (Mg), forhold kalsium/fosfat (Ca_P) og forhold magnesium/kalsium (Mg_Ca). De første to PLS komponentene beskriver 61% og 77% av variasjonen mellom variablene.



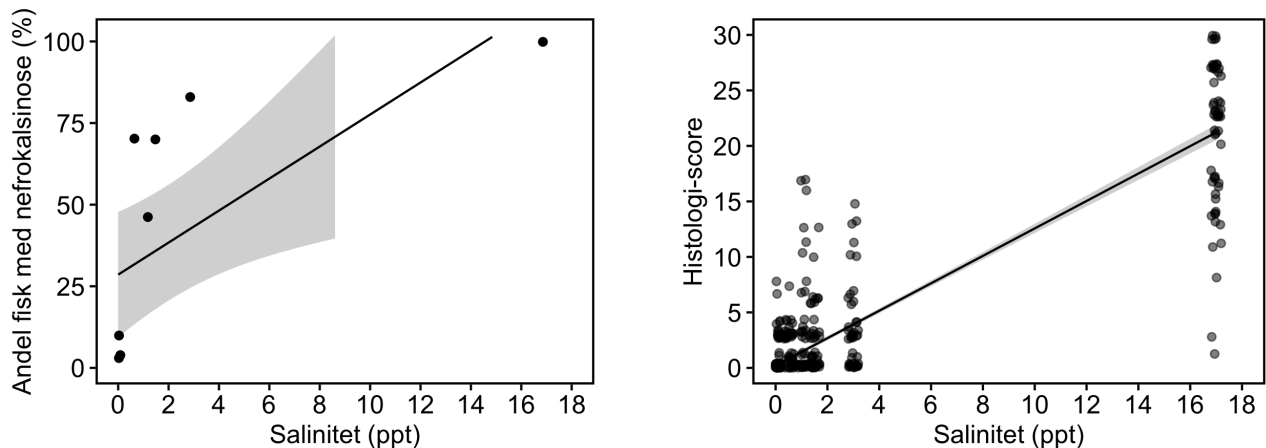
Figur 4.2: Principal component analyse (PCA) av vannkvaliteten i settefiskanleggene fra kartleggingsundersøkelsen (Groups angir anlegg 1-12).

generelt funnet lite nefrokalsinose, og kun milde grader.

Anleggene som benyttet sjøvannstilsetning i produksjonen hadde ulike strategier når det gjaldt både oppstart, konsentrasjon, og om tilsetningen økte underveis. I anlegg 4, der fisken hadde mest alvorlig nefrokalsinose var salinitet på 2.7-2.9 ppt inntil 3 måneder før prøveuttak. Saliniteten ble økt til 8-10 ppt 1 måned før prøveuttak og videre til 12-15 ppt 2 uker før prøveuttak.

Anlegg	Salinitet (ppt)	Type tilsetning
3	1,5	Sjøvann
4	17	Sjøvann
6	0,5	Sjøvann
7	3	Sjøvann
11	1	Salt

Tabell 4.2: Salinitet i settefiskanleggene som tilsatt sjøvann eller salt. Tabellen viser kun verdier som ble målet under kartleggingen (mot sjø-utsett).



(a) Andel fisk med nefrokalsinose (%) fordelt på salinitet i ulike settefiskanlegg. Hvert punkt representerer 1 anlegg. Linjen viser linear regresjon med standard avvik ($p < 0,05$, $R^2 = 0,45$).

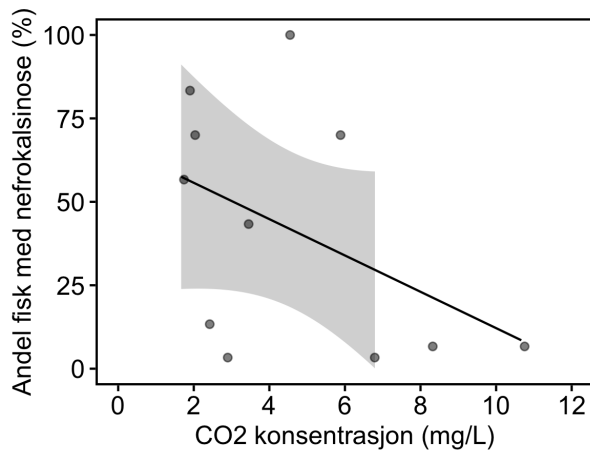
(b) Nefrokalsinose-score vurdert histopatologiske fordelt på salinitet i ulike settefiskanlegg. Hvert punkt representerer 1 fisk. Linjen viser linear regresjon med standard avvik ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,80$).

Figur 4.3: Nefrokalsinose fordelt på salinitet i ulike settefiskanlegg.

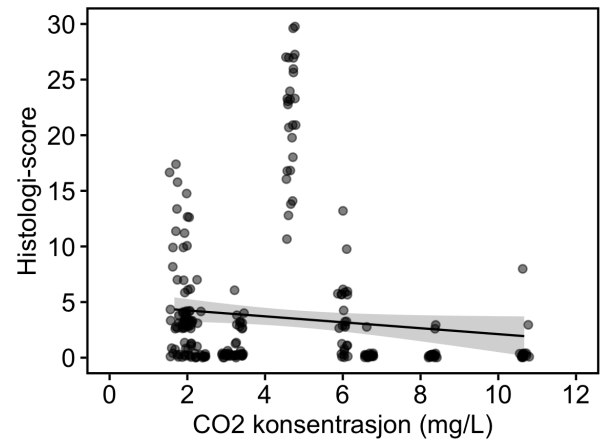
Ved prøveuttak hadde fisken oppholdt seg i driftsvann på 17 ppt kun i noen dager.

Parr tåler salinitet på 0-10 ppt, men dør ved 31 ppt (Duston 1994) mens smolt tåler saliniteter i området 12-36 ppt (Attramadal 2020). I kartleggingsundersøkelsen tok vi et prøveuttak tett opp mot utsett i sjø, og alle prøver tydet på at fisken var smoltifisert og dermed tålte sjøvannskonsentrasjonene som ble benyttet. Men, sjøvannstilsetningen begynte tidligere i produksjon, allerede før smoltifisering. Dette kan ha medført at fisken ble utsatt for osmoregulatorisk stress som påvirket ionbalanse i fisken og videre trolig førte til ansamling av mineralkomplekser i nyrene. Resultatene støttes av funn i kap. 5 (Uttesting av tiltak i anlegg).

Det er faglig uenighet om høye CO_2 -verdier i vannet kan forårsake nefrokalsinose (f.eks. Fivelstad et al., 2015b; 2018; Hosfeld et al., 2008; Khan et al., 2018 mot Good et al., 2018; Mota et al., 2019). Resultatene av *NEFROSMOLT*-prosjektet viste ingen korrelasjon mellom CO_2 konsentrasjoner i vann og utvikling av nefrokalsinose hos fisken (Fig. 4.4).



(a) Andel fisk med nefrokalsinose (%) fordelt på CO₂ konsentrasjoner i ulike settefiskanlegg. Hvert punkt representerer 1 anlegg. Linjen viser linear regresjon med standard avvik ($p > 0,05$, $R^2 = 0,19$).



(b) Nefrokalsinose-score vurdert histopatologiske fordelt på CO₂ konsentrasjoner i ulike settefiskanlegg. Hvert punkt representerer 1 fisk. Linjen viser linear regresjon med standard avvik ($p > 0,05$, $R^2 = 0,01$).

Figur 4.4: Nefrokalsinose fordelt på CO₂ konsentrasjoner i ulike settefiskanlegg.

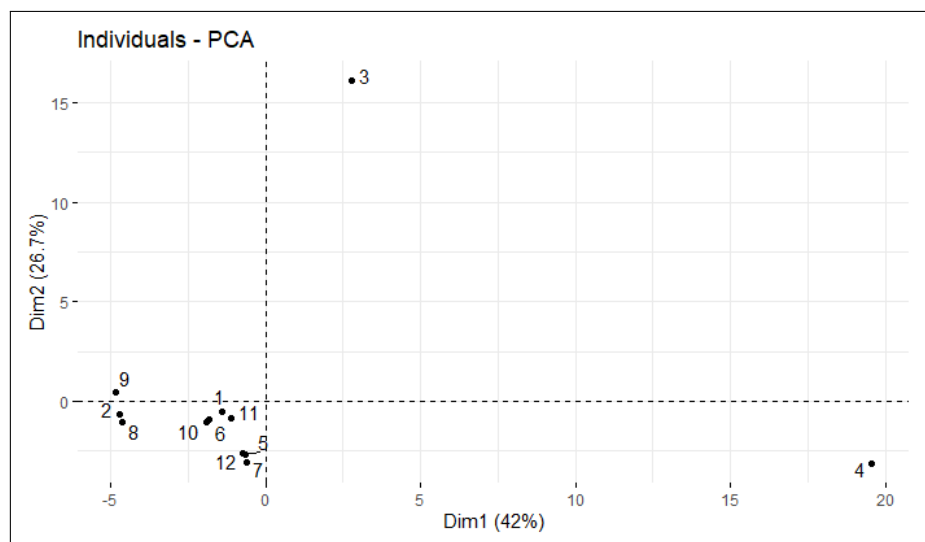
4.3.2 Effekt av fôrsammensetning på utvikling av nefrokalsinose

De 12 ulike fiskegruppene hadde blitt fôret med fôr fra ulike produsenter. Fisken fra anlegg 1, 3, 9 og 11 hadde fått saltfôr, og hadde signifikant høyere nivå av natrium og klorid i prøvene sammenliknet med de øvrige anleggene (Tab. 4.3). Videre var det forskjeller i flere parametere mellom anleggene (Tab. 4.3), men samlet sett var det fôrene i anlegg 3 og 4 som skilte seg mest fra de øvrige fôrene og også fra hverandre (Fig. 4.5). Videre undersøkelser fant få forskjeller i aminosyrer mellom de ulike fôrene, untatt for hydroxyprolin i anleggene 3, 6 og 10 (Fig. V7). Fettsyreprofilen til fôrene var ulike, i hovedsak var det anlegg 3 og 4 som her skilte seg fra de andre fôrene og fra hverandre (se Fig. V8 for mer detaljer).

Forskjeller i fôr som var brukt i de ulike anleggene samsvarte ikke med forskjellene i andel fisk med nefrokalsinose (Fig. 4.5). Av anleggene som hadde størst andel fisk med nefrokalsinose var det kun anlegg 3 og 4 som benyttet fôr som skilte seg fra de øvrige og fra hverandre. Dette tyder på at utvikling av nefrokalsinose hos fisk ikke var direkte relatert til fôrsammensetningen. Det er likevel en mulighet for at suboptimal fôrsammensetning kan forverre tilstanden i enkelte tilfeller, men prosjektet kan ikke konkludere med dette. Videre undersøkelser bør gjennomføres for å besvare spørsmålet.

Anlegg	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parameter												
Aske(%)	14 ^a	9,4 ^b	14 ^a	7,2 ^b	7,8 ^b	9,7 ^b	8,2 ^b	9,3 ^b	15 ^a	8,8 ^b	13 ^a	9,6 ^b
Fett (%)	23,7 ^{ab}	22,3 ^{ab}	28,6 ^a	21,7 ^{ab}	22,3 ^{ab}	22,9	21,7 ^{ab}	19,9 ^b	18,7 ^b	21,3 ^b	21 ^b	21,1 ^b
Fosfor (mg/g)	15	13	15	16	14	16	14	12	12	16	15	16
Fe (mg/kg)	240 ^a	130 ^b	310 ^a	310 ^a	260 ^a	260 ^a	170 ^{ab}	200 ^a	160 ^{ab}	170 ^{ab}	190 ^a	260 ^a
K (mg/g)	11	13	8,8	10	11	11	11	12	11	11	9,8	12
Ca (mg/g)	14 ^a	16 ^{ab}	16 ^{ab}	12 ^{ab}	11 ^{ac}	17 ^b	13 ^a	17 ^b	20 ^b	18 ^b	16 ^{ab}	15 ^{ab}
Karbo. (%)	14	15	13	11	14	17	14	15	15	14	16	16
Cl (mg/g)	51 ^a	9,7 ^b	37 ^a	7,8 ^b	5,5 ^c	14 ^b	8,8 ^b	14 ^b	51 ^a	8,5 ^b	25 ^c	7,2 ^b
Mg (mg/g)	2,3 ^{ab}	2,7 ^{ab}	2,0 ^{ab}	2,3 ^{ab}	2,4 ^{ab}	2,6 ^{ab}	2,4 ^{ab}	3,0 ^a	2,8 ^{ab}	2,4 ^{ab}	2,1 ^b	2,4 ^{ab}
Na (mg/g)	35 ^a	6,9 ^b	27 ^a	5,7 ^b	5,4 ^b	7,6 ^b	6,6 ^b	6,4 ^b	30 ^a	59 ^c	31 ^a	8,8 ^b
Protein (%)	44	50	41	48	47	48	47	50	46	46	43	45
Tørrstoff (%)	95	95	95	91	94	93	92	94	93	92	93	94
Vanninnh.(%)	5,4 ^a	5,1 ^a	5,4 ^a	9,3 ^b	5,5 ^a	7,1 ^{ab}	7,7 ^{ab}	6,3 ^a	6,6 ^a	8,1 ^a	6,9 ^a	6,1 ^a
Vit. D3 (IU/g)	6,54	7,68	12	8,36	5,93	6,93	5,32	5,2	5,45	6,16	7,25	6,12

Tabell 4.3: Oversikt over innhold i fôr fra 12 ulike settefiskgrupper (Aske, Fett, Fosfor, Jern (Fe), Kalium (K), Kalsium (Ca), Karbohydrater (Karbo), Klorid (Cl), Magnesium (Mg), Natrium (Na), Vanninnhold (Vanninnhold.), Vitamin D3 (Vit. D3). Data på samme rad som ikke deler bokstavangivelse er signifikant forskjellige ($p < 0,01$).



Figur 4.5: Principal component analyse (PCA) av fôrkomponenter i settefiskfôr fra kartleggingsundersøkelsen (Hvert punkt representerer fôr fra anlegg 1-12).

UTTESTING AV TILTAK I ANLEGG

5.1 Introduksjon

I gjennomstrømningsanlegg med tradisjonell lysstyring, er det vanlig å gi fisken et «vintersignal» (12 timer lys og 12 timer mørke), som skal simulere kortere daglengde, før man gir lys gjennom hele døgnet. Denne endringen i daglengde imiterer vårperiode, og stimulerer smoltifisering, som gjør fisken klar for å vandre ut i sjøen (Duston Saunders, 1990; Thrush et al., 1999).

Bruk av sjøvann i produksjon har vært økende i oppdrettsnæringen og bakgrunnen for bruk av sjøvann i produksjon kan knyttes til at man har sett at utvikling av HSS stopper opp eller bremses ved overføring til sjø (Sommerset et al., 2022). Sjøvannsinnblanding er også benyttet for å holde fisken i «smoltvinduet», for å unngå desmoltifisering (Mortensen et al., 1998). Det er likevel stor variasjon i hvordan sjøvann benyttes i produksjonen, både med hensyn til tidspunkt for sjøvannstilsetning og konsentrasjoner benyttet. Vi vet per i dag for lite i dag om effektene av å introdusere brakkevann til fisken i ulike utviklingsstadier. Det rapporteres også at den positive effekten på utvikling av HSS oppnås i mindre grad enn tidligere, uten at vi vet hvorfor.

I kartleggingsundersøkelsen vår (Klykken et al., 2022; se kap. 4) ble tilsetning av sjøvann i produksjon avdekket som en risikofaktor for utvikling av nefrokalsinose. Det ble foreslått at tilsetning av sjøvann for tidlig i produksjon, altså allerede før smoltifisering, kunne ha ført til osmoregulatorisk stress hos fisken. Dette kunne igjen ha resultert i utfellinger av mineraler i nyrene. For å teste hypotesen ble et tiltaksforsøk gjennomført hos et av anleggene fra kartleggingsundersøkelsen.

5.2 Materiale og metoder

5.2.1 Forsøksoppsett

Det var opprinnelig planlagt å vurdere tiltak i 2 ulike settefiskanlegg. Dessverre ble det kun 1 anlegg som ble med videre i denne oppfølgingen. Anlegget benyttet gradvis sjøvannstilsetning

frem mot utsett i sjø, og tiltaket som ble foreslått var å differensiere på sjøvannstilsetningen mellom to ulike kar i produksjonen, der et kar skulle holdes under 2 ppt frem til utsett og det andre karet kunne driftes som normalt (gradvis økning mot 5 ppt frem mot utsett). Dessverre ble ikke oppsettet fulgt med bakgrunn i redusert tilgang på ferskvann. Ingen av karene ble holdt under 2 ppt, men i stedet ble det gradvis økt salinitet frem mot utsett. Derfor representerer de to karene i undersøkelsen ikke to ulike oppsett, men fungerer i stedet som replikater.

5.2.2 Biologi

Det ble tatt ut månedlige prøver fra november 2020 til april 2021, totalt 330 individ. Ved hvert prøvetakingspunkt ble 30 fisk fra to forskjellige kar tatt ut. Fisken ble ikke sultet før prøvetaking og de ble avlivet med en overdose Benzoak VET (200–400 mg/l) etterfulgt av et kraftig slag mot hodet. En generell helsevurdering og fysiske observasjoner inkludert diagnostikk av hemorragisk smolt syndrom (HSS) og en evaluering av morfologiske endringer relatert til parr-smolt-transformasjon (smoltifisering; sølvfarge, mørkere finnekant, parr-merker) ble utført ved hver prøvetaking. Nefrokalsinose ble vurdert hos alle undersøkte individ, som beskrevet i kap. 3.2.1, mens HSS ble vurdert som beskrevet i kap. 3.2.1. Det ble tatt ut blodprøver, etter metoden beskrevet i kap. 3.2.1. Følgende parametere ble målt: aspartataminotransferase (AST), kalsium (Ca), natrium (Na), kalium (K), klorid (Cl) og magnesium (Mg).

Vev fra nyrene ble isolert og umiddelbart overført til rør som inneholdt RNAlater ©(Life technologies, Oslo, Norge) og lagret ved 4 °C i 24 timer før lagring ved -20 °C frem til analyse (N=330). Et utvalg av fisk med (N=51) og uten nefrokalsinose (N=75) fra de ulike prøvetakingstidspunktene ble analysert med qPCR. 4 gener knyttet til kalsium-homeostase og kalsifisering av bløtvev ble undersøkt. Normalisert genuttrykk ble beregnet ved hjelp av metoden for relativ uttrykksforhold beskrevet av Pfaffle (2001).

Fra de 330 individene som ble prøvetatt, ble 16 fisk fra ett kar valgt i henhold til kriteriene om enten å være friske (Ctrl, N=8) eller ha mild grad av nefrokalsinose (NC, N=8) for analyse av genregulering med RNA sekvensering. For detaljert metodebeskrivelse se kap. 3.2.1.

Det ble tatt ut prøver av 2. gjellebue for måling av gjelle ATPase-ekspresjon. Analysene ble utført av Pharmaq Analytiq AS. Produktet deres «Smoltvision» ble benyttet, og målte uttrykket av tre forskjellige genmarkører; Na^+, K^+ -ATPase (NKA) $\alpha 1a$ isoform (FW NKA), Na^+, K^+ -ATPase (NKA) $\alpha 1b$ isoform (SW NKA) og en kofaktor.

5.2.3 Vannkvalitet

Vannkvaliteten ble rutinemessig overvåket av anlegget og holdt innenfor anbefalte områder for atlantisk laks (Noble et al., 2018). I tillegg ble triplikatprøver fra hvert kar samlet inn månedlig i 0.5 L plastflasker og umiddelbart lagret i isbokser og holdt ved 4 °C frem til analyse. Fotometeret WTW Photoflex Turb Set (WTW, Weilheim, Tyskland) ble brukt til å måle kalsium, magnesium, fosfat og jern. Alkalinitet ble indirekte målt med et pH-meter og Orion Total Alkalinity testsett (Orion Research, Inc.).

5.2.4 Statistiske analyser

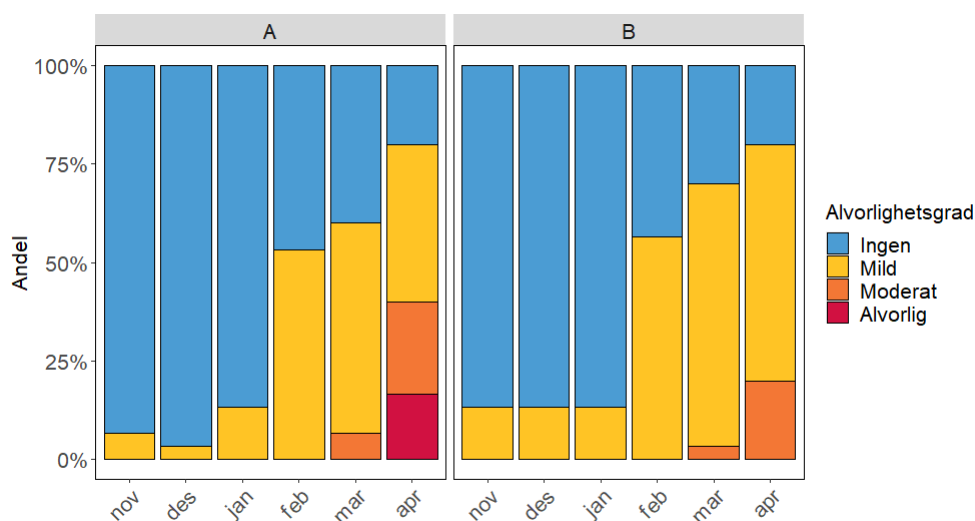
Alle statistiske analyser ble utført med R open source-programvare (R Core Team, 2019). Signifikansnivå var satt til $p < 0.05$. Normalfordistribusjon av data ble testet med Shapiro-Wilk's test. Ved normalfordistribusjon av data ble det benyttet enveis ANOVA for å undersøke signifikante forskjeller i datasettet. Student-test ble utført for parvis sammenlikning av gruppene. Der data ikke var normalfordelt, ble Kruskal-Wallis test eller Wilcoxon rank sum test benyttet som et ikke-parametrisk alternativ til enveis ANOVA for å undersøke signifikante forskjeller i datasettet. Dersom Kruskal-Wallis var signifikant ble post-hoc parvis Mann-Whitney Wilcoxon test utført for å undersøke variasjoner mellom grupper. P-verdier ble justert ved hjelp av Bonferroni-korreksjon.

Wald test ble benyttet for å teste signifikans av ekspresjon i RNA sekvenseringen mellom gruppene og genererte en p-verdi for hvert gen. False discovery rate (FDR) av p-verdi ble estimert med Benjamini og Hochberg metoden (Benjamini Hochberg, 1995).

5.3 Resultater og diskusjon

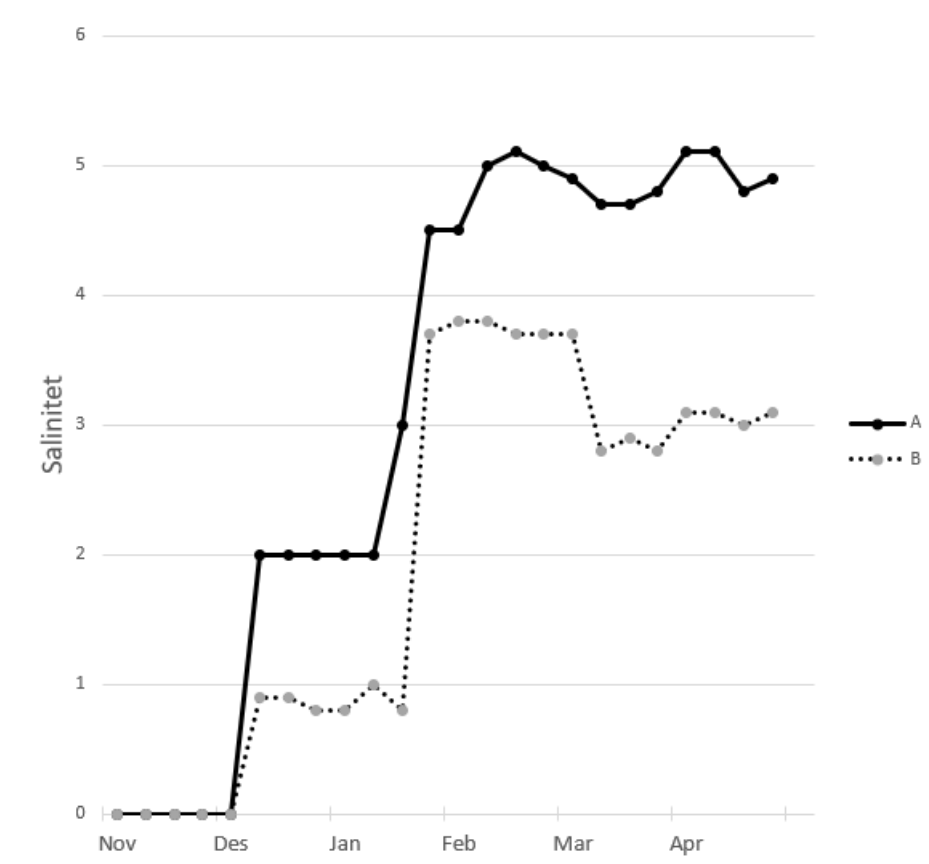
5.3.1 Nefrokalsinose og sjøvann

Det ble observert en signifikant økning i andel fisk med nefrokalsinose fra januar til februar (40% økning) i begge undersøkte kar (Fig.5.1). I samme periode økte salinitet i begge kar (Fig.5.2) og følgelig konsentrasjon av magnesium og kalsium i karvannet (Tab.5.1). Øvrige vannkvalitetsparametere endret seg ikke, men temperaturen gikk ned fra november til desember og lysstyring ble endret fra 12:12 til 24:0 i februar.



Figur 5.1: Andel fisk (%) uten og med nefrokalsinose fordelt på alvorlighetsgrad i to ulike kar (A og B) fordelt på dato.

Dataene kan tyde på at det var en tidsskorrelasjon mellom økning i salinitet og økning i andel nefrokalsinose, siden det ikke var andre endringer i de registrerte miljøparametere i samme

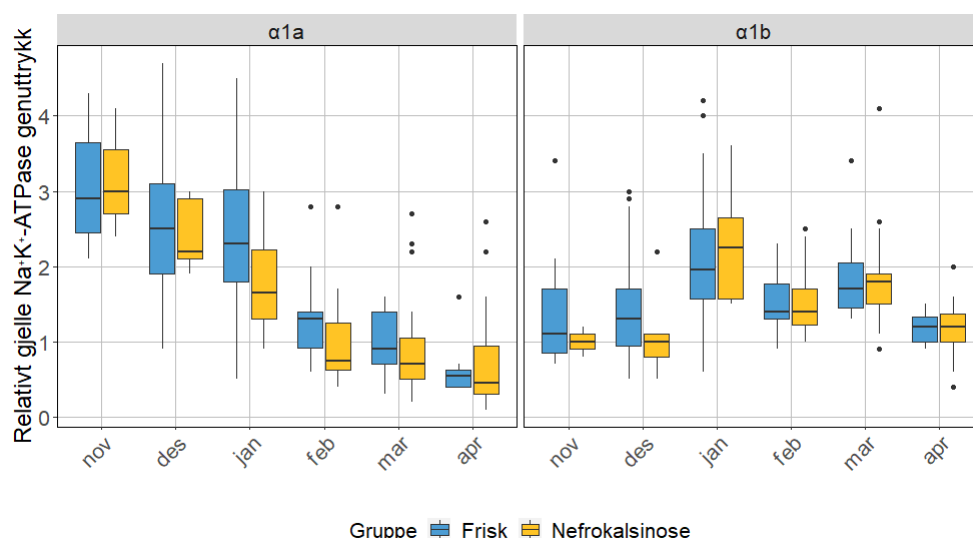


Figur 5.2: Målt salinitet i kar A (sort linje) and B (striplet linje) fra november 2020 til april 2021.

Tabell 5.1: Miljøparametere for kar A og B fra november 2020 til april 2021. Temperatur (Temp., °C), oksygenmetning (O₂, %), Lys:Mørke (L:D), CO₂ (mg/L), Salinitet (Sal, ppt), alkalitet (Alk, ppm CaCO₃), Kalsium (Ca, mg/L), Magnesium (Mg, mg/L) og Fosfat (PO₄, mg/L).

	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr
Temp.	6.0 ± 0.5	4.3 ± 0.5	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.2
O ₂	85%	85%	85%	85%	85%	85%
L:D	12:12	12:12	12:12	24:0	24:0	24:0
Kar A						
CO ₂	5.0	NA	4.0	4.0	2.0	NA
Sal	0 ± 0	1.6 ± 0.8	3.5 ± 1.1	5.0 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1
Alk	0.0 ± 0.0	11.2 ± 3.4	16.0 ± 1.3	15.7 ± 0.4	15.3 ± 0.5	14.6 ± 0.6
Ca	12.0 ± 3.5	27.0 ± 4.4	56.0 ± 2.0	64.0 ± 3.0	69.3 ± 0.6	70.1 ± 0.6
Mg	< 5.0	59.7 ± 16.3	193.7 ± 50.6	254.7 ± 2.1	161.0 ± 15.7	189.7 ± 11.2
PO ₄	0.05 ± 0.04	0.1 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Kar B						
CO ₂	5.0	NA	5.0	6.0	4.0	NA
Sal	0 ± 0	0.7 ± 0.3	2.3 ± 1.4	3.7 ± 0.0	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.0
Alk	2.2 ± 0.7	6.7 ± 1.6	12.9 ± 0.5	13.4 ± 1.4	10.0 ± 1.2	9.6 ± 0.8
Ca	< 10	15.0 ± 2.7	50.7 ± 6.7	67.7 ± 13.6	45.7 ± 2.1	44.3 ± 1.5
Mg	< 5	48.4 ± 0.6	135.0 ± 4.6	226.7 ± 29.4	89.7 ± 4.7	91.7 ± 16.2
PO ₄	0.04 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01

periode. Salinitetsøkningen ble startet mens fisken fikk «vintersignal» (12:12 lys:mørke), på dette tidspunktet var genuttrykk for NKA α -1a isoformen høyere enn for NKA α -1b isoformen (Fig.5.3), som angir at fisken ikke er klar for sjøutsett. Basert på våre resultater ser det derfor ut til at sjøvannstoleranse i gjellene ikke var oppnådd før brakkvann ble introdusert til fisken.

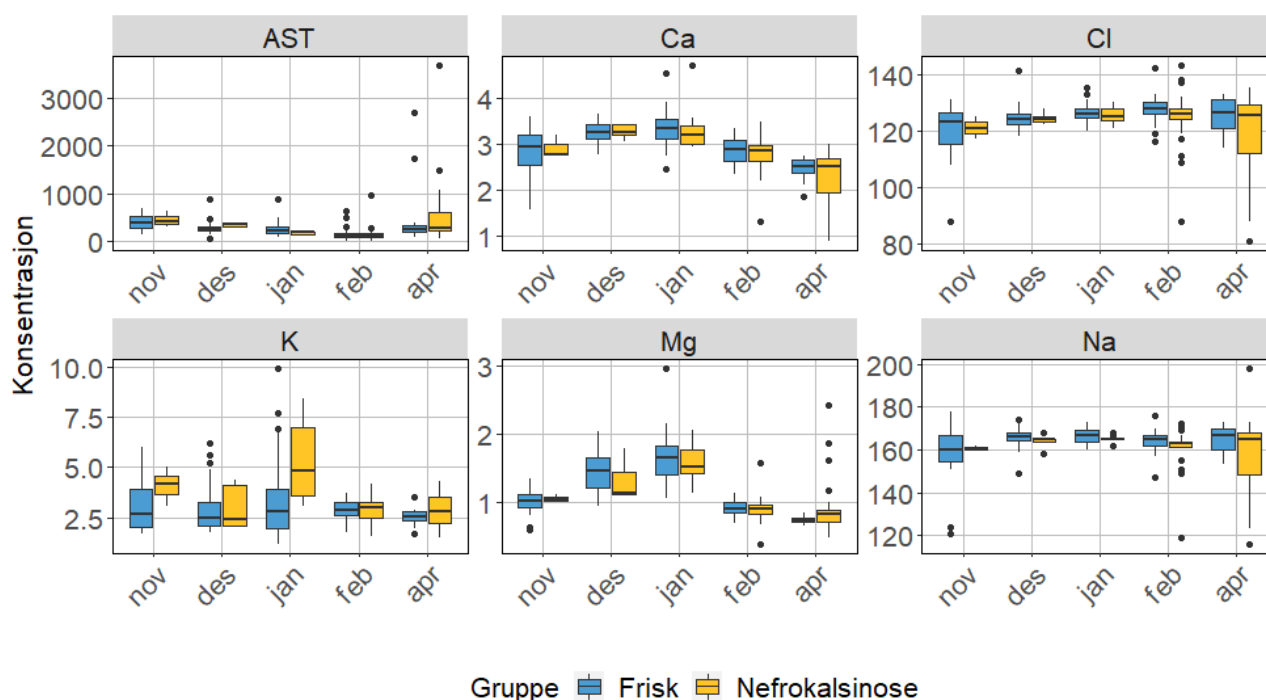


Figur 5.3: Forandringer i Na^+, K^+ -ATPase α -1a og α -1b isoform mRNA ekspresjonsnivå i gjelle hos laks med og uten nefrokalsinose under smoltifisering.

Effekten av økte mengder divalente ioner i karvannet var tydelig i blodkjemi hos fisken (Fig.5.4). Både fisk med og uten nefrokalsinose fikk en signifikant økning i konsentrasjonen av kalsium og magnesium i blodet i desember og januar sammenliknet med månedene før og etter. Denne økningen er sammenliknbar med det man ser etter en 24-timers sjøvannstest (Nieves-Puigdoller et al., 2007) og nedjustering til normalnivåer er vanligvis oppnådd innen 2 uker (Urke et al., 2014). Nivåene av kalsium og magnesium i plasma var forøket både i desember og januar, og nedregulering var først oppnådd i februar. Nedreguleringen av kalsium og magnesium i februar kan tyde på at nyrene hadde oppnådd sjøvannstilpasning på dette tidspunktet og var i stand til å skille ut divalente ioner. Prøvene i februar ble tatt ut 2,5 uke etter at lysstyringen ble endret til 24:0. På samme prøvetakingstidspunkt var også NKA-uttrykket i gjellene endret, slik at gjellene på dette tidspunktet var tilpasset sjøvann (Fig.5.3).

I perioden november til januar sank temperaturen fra 6 °C til 3.4 °C. Lave temperaturer er vist å redusere metabolisme (Brett, 1971; Claireaux Lagardere, 1999), og Bakke et al. (1991) fant at post-smolt strever med å opprettholde osmoregulering ved skiftende saliniteter og at dette er mest krevende ved lave og høye temperaturer. Det var ingen forskjell i blodkjemi hos fisk med og uten nefrokalsinose, med unntak av kaliumkonsentrasjonen i januar (Fig.5.4), som kan tyde på at fisk med nefrokalsinose har større utfordringer med osmoregulering (Cardeilhac et al., 1979). Begge disse momentene kan ha hatt innvirkning på utviklingen av nefrokalsinose i de to karene.

I løpet av disse prøvetakingene opplevde fisken å stå med hyperkalsemi over lenger tid. Dette kan enten skyldes at anlegget gradvis tilsatte mer sjøvann, som førte til at fisken stadig måtte forsøke å justere opptak og utskillelse. Når saliniteten i driftsvannet ble holdt stabilt, kom



Figur 5.4: Blodkjemiparametere hos laks med og uten nefrokalsinose. Aspartat aminotransferase (AST), Kalsium (Ca), Klorid (Cl), Kalium (K), Magnesium (Mg), Natrium (Na).

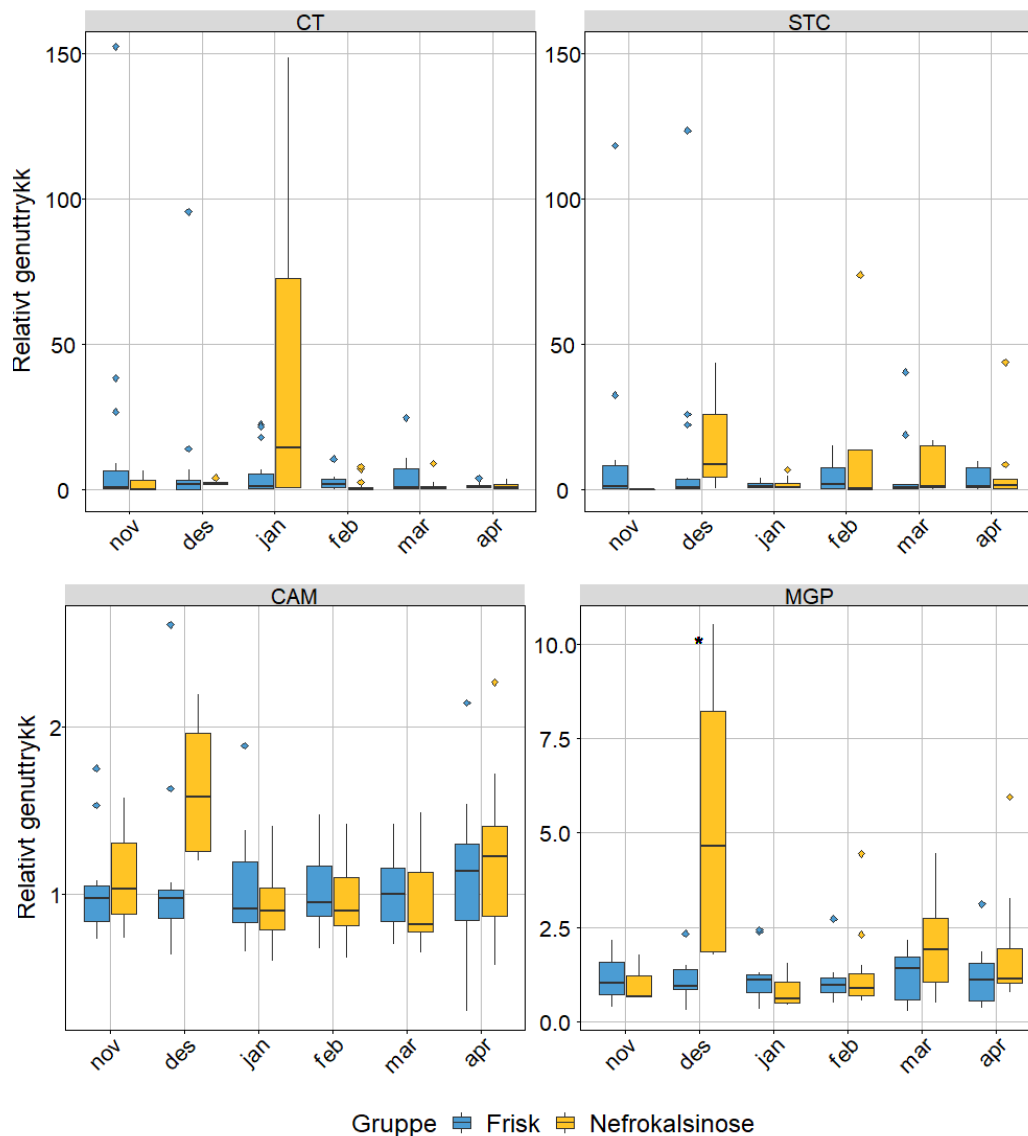
konsentrasjonen i plasma ned på samme nivå som før eksponering for brakkvann. En annen mulig årsak kan være at fisken ble eksponert for økte mengder ioner før den var smoltifisert, og dermed ikke var i stand til å håndtere den økte tilgangen, men at homeostase ble oppnådd i februar når kontinuerlig lys ble startet og at fisken dermed smoltifiserte. Det er også mulig at fisken smoltifiserte pga. eksponering for brakkvann.

Fisk med nefrokalsinose (NC) viste 282 oppregulerte gener og 150 nedregulerte gener sammenlignet med kontrollgruppen (Ctrl). «ECM-reseptor interaction» var den eneste signifikant KEGG-pathway, med 18 gener betydelig oppregulert i NC-gruppen. Blant de oppregulerte gene-ne var flere kollagener, lamininer, trombospondiner og integriner alle knyttet til opprettholdelse av vevsstruktur og funksjon. Det er derfor sannsynlig at mild nefrokalsinose medfører vesentlige endringer i vevsstrukturen som må motvirkes for å opprettholde nyrefunksjon.

Videre viste RNA-sekvenseringen at NC gruppen hadde betydelig nedregulering av gener relatert til kalsiumsignalisering og homeostase, samt oppregulering av Matrix GLA-protein, en forkalknings-hemmer i februar. qPCR-resultatene viste videre at kalsitonin (CT) hadde høyere genuttrykk i NC-gruppen i januar, mens stanniokalsin (STC), kalmodulin (CAM) og matrix GLA-protein (MGP, $p < 0,05$) hadde høyere genuttrykk i desember i NC gruppen sammenlignet med Ctrl (fig.5.5, ekstreme uteliggere i CT og STC ikke vist).

Både CT og STC er hormoner som opprettholder interne kalsiumnivå i kroppen, ved å hhv. stimulerer osteoblastaktivitet for å danne bein og skjell (Dominguez et al., 2019) og nedregulere kalsiumopptak over gjeller (Wagner et al., 1998; Wagner, 1993; Guerreiro et al., 2002), samt hemme opptak av kalsium i tarm (Sundell et al., 1994). Kalmodulin spiller en rolle i kalsiumhomeostase gjennom å beskytte mot kalsiumtoksisitet ved å holde den intracellulære

kalsiumkonsentrasjonen lav (Wongdee & Charoenphandhu, 2013). Kalmodulin er et av de mest tallrike og velkarakteriserte Ca^{2+} -sensorproteinene i vertebrater (Ikura et al., 2006) og Flik et al. (1984) demonstrerte at kalmodulin regulere permeabiliteten til fiskens hud for vann og ioner.



Figur 5.5: Box-plot som viser log2 qPCR-ekspressionsratio for kalsium-signalrelaterte gener. qPCR-ekspressionsforhold er normalisert til det geometriske gjennomsnittet av uttrykksforhold til ef1. Bokser markerer interkvartilområdet, linjen som deler boksene angir medianen, værhar strekker seg til $1,5 \times$ interkvartilområde, punkter utenfor værharområdet vises som uteliggere, asterisker markerer signifikante forskjeller mellom gruppene ($p < 0,05$). Forkortelser: kalmodulin (CAM); kalsitonin (CT); matrix GLA protein (MGP); stanniokalsin (STC).

Det ble ikke observert forskjeller i blodkjemi mellom NC-gruppen og Ctrl. Likevel var det en forskjell i hvordan kalsium signalrelaterte gener ble uttrykt. Det er mulig at økt genuttrykk for CT, STC og CAM kan knyttes til økte mengder kalsium i nyrene, og ikke direkte til kalsium i plasma. Den hypokalsemiske effekten av disse genene kan ha blitt motvirket av at CT i tarm og nyre forhindrer frigjøring av kalsiumioner og kalsiumutskillelse (Guerreiro et al., 2002). Denne endringen i genregulering kan være relevant for dannelsen av kalsiumutfellinger i nyrene. Sha-

vit et al. (2015) foreslo at lokal dysregulering av kalsiumhomeostase i nyrenes interstitium kan ha en nøkkelrolle i patogenesen av nefrokalsinose hos mennesker. Det kan være at dette også gjelder for fisk.

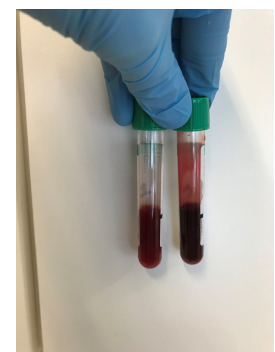
Den nøyaktige molekylære virkningsmekanismen til MGP er ikke kjent, men de samlede resultatene fra studier på MGP indikerer at den virker som en fysiologisk hemmer av mineralisering (Conceicao et al, 2008). Roberto et al. (2009) fant MGP uttrykt i nyrene hos piggvar og foreslo at dette kan knyttes til behovet for å forhindre passiv akkumulering av kalsium i vevet hos fisk. Genuttrykket for MGP var signifikant økt i NC-gruppen i desember. Det er mulig at denne responsen ikke var tilstrekkelig for å forhindre mineralisering.

5.3.2 HSS

Totalt 25 fisk ble diagnostisert med Hemorragisk smoltsyndrom (HSS). Individene viste alle karakteristiske tegn på HSS (Fig.5.6). HSS er en sykdom med ukjent etiologi som er rapportert hos pre-smolt i Norge og Skottland (Bruno et al., 2013). Rodger & Richards (1998) var ikke i stand til å overføre HSS mellom fisk, noe som peker på en ikke-smittsom etiologi. Sykdommen er preget av bleke gjeller, gul lever, blødning ved finnebasene, lav hematokrit, multippel blødning i organer og endotelvev, og nyrepatologi (Bruno et al., 2013). Alle de typiske kliniske tegnene på HSS ble observert i vår studie, inkludert hemodilusjon (Fig.5.6b). Plasmanivåene av klorid, natrium og kalsium i fisk med HSS var signifikant lavere sammenlignet med frisk fisk og plasmakaliumkonsentrasjonene var signifikant høyere, noe som indikerer at den syke fisken led av forstyrret osmoregulatorisk funksjon (Weichert et al., 2021).



(a)



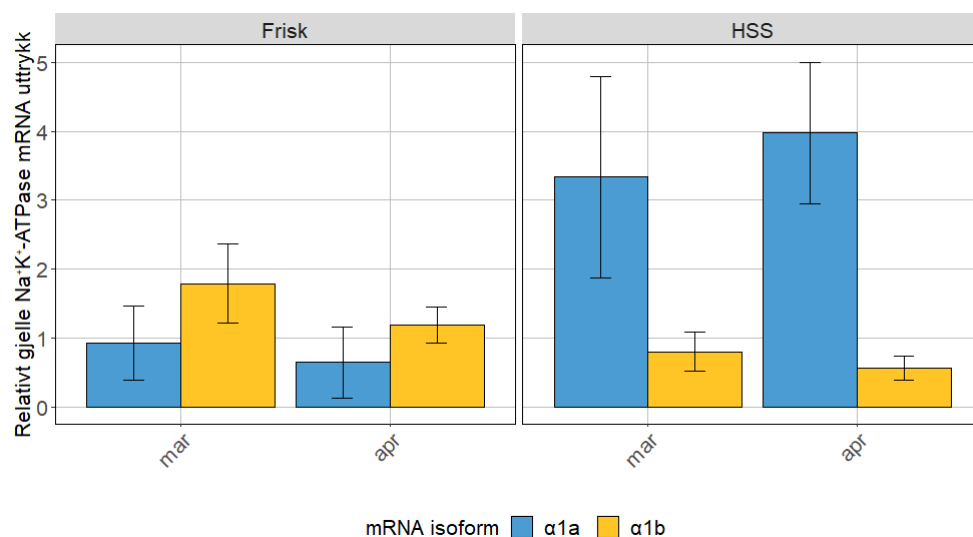
(b)

Figur 5.6: HSS hos atlantisk laks - a) generaliserte viscerale petekkier og ekkymoser som involverer mage-tarmkanalen, svømmeblære og peritoneum, visceralt fettvev, hjerte og somatisk muskulatur, med ascites. b) Hemodilusjon - venstre; Li-hep rør med blod fra fisk rammet av HSS, høyre; Li-hep rør med blod fra frisk fisk.

Parameter	Frisk	HSS
AST (U/L)	584.4 ± 833.0	543.9 ± 484.8
Ca (mmol/L)	2.5 ± 0.3	1.5 ± 0.6*
Mg (mmol/L)	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.7
Na (mmol/L)	164.4 ± 6.6	137.0 ± 15.2*
K (mmol/L)	2.6 ± 0.5	3.3 ± 0.7*
Cl (mmol/L)	125.9 ± 6.0	99.8 ± 14.6*

Tabell 5.2: Blodkjemiparametere hos laks med og uten HSS. Aspartat aminotransferase (AST), Kalsium (Ca), Klorid (Cl), Kalium (K), Magnesium (Mg), Natrium (Na). Signifikante forskjeller er vist med * ($p < 0.05$).

Vi observerte også et større relativt uttrykk for Na^+, K^+ -ATPase α -1a isoform sammenlignet med den friske fisken, i samme størrelsesområde som prøvetakingen foretatt i november (parr) og lavere relativ uttrykk for Na^+, K^+ -ATPase α -1b isoform sammenlignet med de friske individene ved begge prøvetakingspunktene, noe som ytterligere støtter at HSS er en osmoregulatorisk sykdom i samsvar med funnene gjort av Krasnov et al., (2020). Endringen i genuttrykksmønstre for fisk med HSS kan være en respons på tap av ioner til miljøet forårsaket av flere blødninger i fisken.



Figur 5.7: Forandringer i Na^+, K^+ -ATPase α -1a og α -1b isoform mRNA ekspresjonsnivå i gjelle hos laks med og uten HSS under smoltifisering.

BRUK AV RØNTGEN FOR VURDERING AV NEFROKALSINOSE

6.1 Introduksjon

Histopatologi er det eneste verktøyet næringen har tilgjengelig i dag for presis påvisning av nefrokalsinose med gradering av forandringer helt ned på milde tilfeller (Klykken et al., 2022a), og metoden er både tidkrevende, teknisk krevende og kostbar. Både makroskopisk vurdering og histologi krever avlivning av fisken.

Røntgendeteksjon har tidligere vært brukt for å vurdere ryggvirvel-deformiteter hos laks (bl.a. Drabikova et al, 2021; Holm et al., 2020; Smedley et al., 2018), men felles for disse studiene er bruken av stasjonære apparater som medførte liten grad av fleksibilitet. Bruken av røntgen som metode innen havbruksnæringen har derfor i stor grad vært begrenset til forskning. Det har de siste arene vært en rask utvikling av forbedrede røntgendetektorer og tilhørende bildebehandlingsapplikasjoner (Ou et al., 2021) inkludert bærbare systemer som har et stort potensiale for bruk i helseundersøkelser på kar- og merdkant i havbruksnæringen.

Nefrokalsinose hos atlantisk laks er hovedsakelig identifisert som amCAP (amorf karbonatapatitt, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$) (Klykken et al., 2022a; kap. 3.3.3), som er godt egnet for røntgendeteksjon (Smith et al, 1966). Forskning på nefrokalsinose har blitt sterkt hemmet av mangelen på ikke-invasive, ikke-dødelige metoder for å vurdere tilstedeværelsen og alvorlighetsgraden av denne tilstanden, og til nå har det ikke vært mulig å vurdere sykdomsprogresjon på individnivå over tid. Det er avgjørende å kunne påvise tidlige tilfeller av nefrokalsinose da dette vil gjøre oss istand til å vurdere risikofaktorer som framprovoserer sykdomskomplekset. Videre vil det være av stor nytte å følge sykdomsutviklingen på individnivå over tid. Med et slik verktøy vil det la seg gjøre å undersøke effekt av ulike tiltak for å forebygge og reversere sykdomsutviklingen.

6.2 Materiale og metoder

Totalt ble det tatt prøver av 80 oppdrettslaks fra to fiskegrupper i to ulike RAS-anlegg (resirkulerende akvakultursystem) i Midt-Norge i april 2022. Ingen fisk ble utsatt for eksperimentell manipulasjon, og prøvematerialet representerer derfor fisk under konvensjonelle oppdrettsforhold. Totalt 40 fisk fra hvert anlegg ble tilfeldig tatt ut blant visuelt friske individer (normal svømmeatferd, fravær av ytre skader/lesjoner, ingen tegn til avmagring) innen 2 uker før overføring til sjø. Fisken ble ikke sultet før prøvetaking, og de ble avlivet med en overdose Benzoak VET (200–400 mg/L) og et slag mot hodet. Bortsett fra nefrokalsinose, ble det ikke observert helseproblemer ved den generelle helsevurderingen av de to gruppene. Størrelsesmålinger av individuell fisk inkluderte vekt i g (± 1 g), lengde i cm ($\pm 0,5$ cm), kroppstykkelser i cm ($\pm 0,1$ cm), og kondisjonsfaktor: $CF = 100W/L^3$.

Røntgenbildene ble tatt ved å legge fisken med høyre side ned. Gjennomsnittlig vekt for fiskene var 198 g, med en variasjon fra 109 - 299 g. Det ble benyttet et standard bærbart røntgenapparat (Econet meX+40; kalibrering: kV: 40, mAs: 5) med en digital plate som målte 25 x 32 cm, og deretter digitalisert ved hjelp av en VIVX-V2532P og VXvue. Avstanden mellom lukkeråpningen på røntgenenheten og fisken var ca. 80 cm.

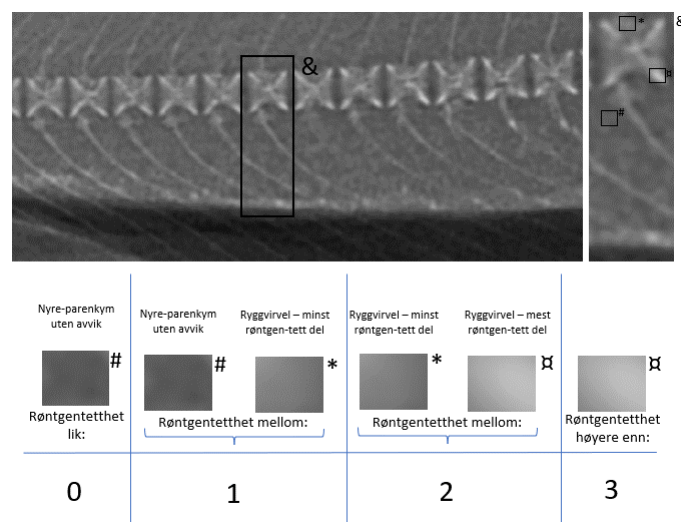
Etter røntgen ble fisken fotografert utvendig, for deretter å åpnes for bilde av nyrevev med makroskopisk vurdering av nefrokalsinose i henhold til Klykken et al. (2022). For å bekrefte visuelle funn ble prøver av midt-nyre fra alle individer analysert av Pharmaq Analytiq AS etter standard histologiske metoder (kap. 3.2.1).

Alvorlighetsgraden av nefrokalsinose ble estimert på røntgenbilder i DICOM-format i QXLink Portable Viewer (Viewworks, Republikken KOREA) ved å vurdere fem forskjellige kategorier som gitt i Tab. 6.1 og Fig. 6.1. Disse kategoriene ble valgt og skåret ved å bruke nefrokalsinosevurdering på histologi fra 17 tilfeldig utvalgte fisk. For å vurdere den totale nefrokalsinose-skåren ble det utført en samlet vurdering av skårene på de 5 kategoriene. Den totale nefrokalsinose-skåren ble kategorisert som ingen, mild, moderat og alvorlig.

For å validere det foreløpige skåringssystemet basert på radiografi, ble 63 fisk diagnostisert kun på røntgenbilder og deretter kontrollert ved å sammenligne resultatene med den histologiske vurderingen. Validiteten til den foreløpige modellen ble vurdert som i hvilken grad skår basert på røntgen var korrelert med resultatene fra histologi, basert på antakelsen om at histologisk skåring var tilstrekkelig objektiv. Korrelasjonen ble sjekket med Spearman rank order test.

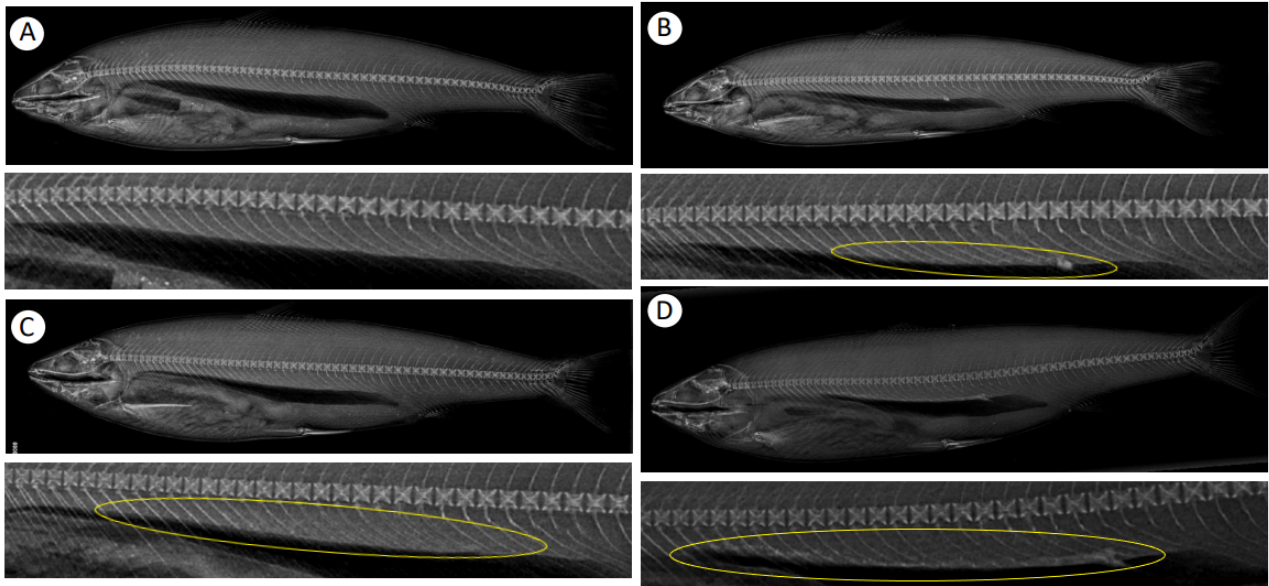
Tabell 6.1: Kategorier for røntgendiagnostikk av nefrokalsinose

Parameter	Score	Vurdering
Tetthet på utfelling	0	Ikke detekterbar (Fig.6.1-0)
	1	Tetthet lik spongiøst ben eller mindre (Fig.6.1-1)
	2	Tetthet mellom spongiøst ben og endeplater på en ryggvirvel (Fig.6.1-2)
	3	Tetthet lik endeplater på en ryggvirvel (Fig.6.1-3)
Arealutbredelse av utfelling	0	Ikke detektert
	1	Utfellinger kun i samlerør
	2	Utfellinger i halve området mellom ryggsøyle og svømmeblære
	3	Utfellinger i 75 % av området mellom ryggsøyle og svømmeblære
Lengdeutbredelse av utfelling	0	Ikke detektert
	1	< 25 % av total lengde
	2	25 - 50 % av total lengde
	3	50 - 75 % av total lengde
Utfelling i blære	0	Ikke detektert
	1	Detektert
Avvikende kontur ventrale avgrensning	0	Ingen avvik
	1	Avvikende kontur

**Figur 6.1:** Tetthet vurdering av utfellinger sammenliknet med tett av bløtvev(#) og ryggvirvel strukturer: spongiosa(*) og endeplater(α)

6.3 Resultater og diskusjon

Fordelingen og tettheten av utfellingene ble tydelig observert på røntgenbildene (Fig.6.2), som gir lovende muligheter for utvikling av en ikke-invasiv vurdering av nefrokalsinose hos oppdrettslaks.

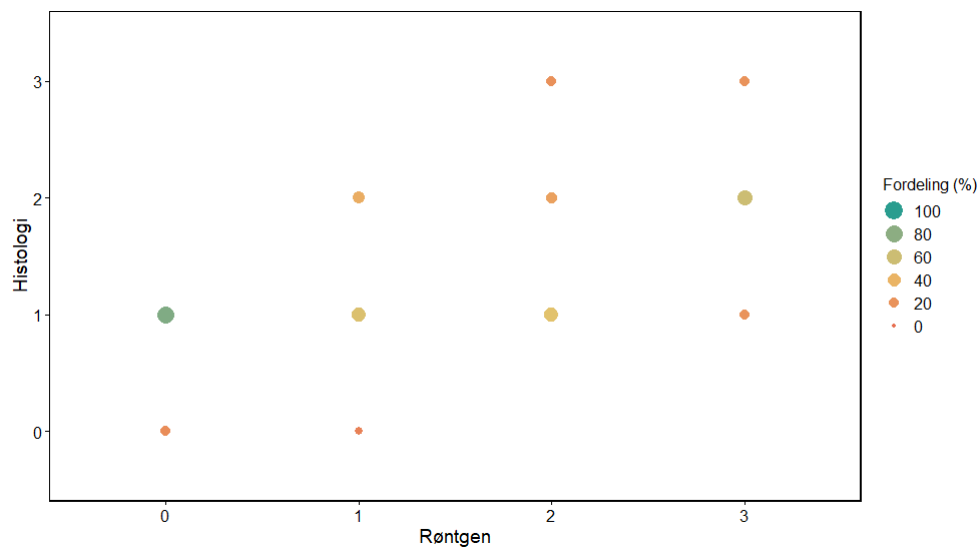


Figur 6.2: Røntgenbilde av fisk med ulike grader av nefrokalsinose, utfellinger markert med gul sirkel: A) ingen, B) mild: mindre utfellinger langs større deler av nyrenes lengde, liten fordeling i det vertikale planet, moderat tetthet på utfellingene, C) moderat: utfellinger i større del av nyrene og langs en større del av lengden på nyrene, moderat tetthet og D) alvorlig: større ansamlinger av mineraler langs hele nyrenes lengde, med større tettheter og fordeling i vevet. Utfellinger i blære med høy tetthet (B) var ikke avgjørende for endringer i nyrevevet observert på histologi, og påvirker i liten grad vurderingen av alvorlighetsgrad på histologi.

De aller fleste fiskene (92.1 %) ble diagnostisert med nefrokalsinose både på histologi og røntgen. De 7.9 % som ikke ble kategorisert med nefrokalsinose på røntgenbilder ble alle diagnostisert som milde forandringer på histologi (Fig.6.4:B1-4). Milde endringer på histologi refererer vanligvis til sparsomme mengder utfellinger i samlekanaler og tubuli, med kun mindre endringer i epitelet til de tubulære strukturene. Det er derfor sannsynlig at tettheten eller mengden av utfellinger var for liten til å kunne oppdages ved radiografi. Det ble observert bakgrunns-artefakter på røntgenbildet av enkelte fisker som kan ha påvirket den radiografiske vurderingen av nefrokalsinose.

3 fisk ble diagnostisert med nefrokalsinose på røntgen, men ikke påvist med histologisk vurdering. En av begrensningene i histopatologi er at det histologiske snittet representerer et todimensjonalt tynt snitt (ca. 3 mikrometer) av et relativt stort organ, og det kan være utfellinger i et plan som ikke er inkludert i snittet. Det er derfor mulig at det ble oppdaget utfellinger ved røntgen som ikke var mulig å identifisere ved histologi. Dette bør undersøkes nærmere da det ikke er mulig å konkludere basert på vår studie.

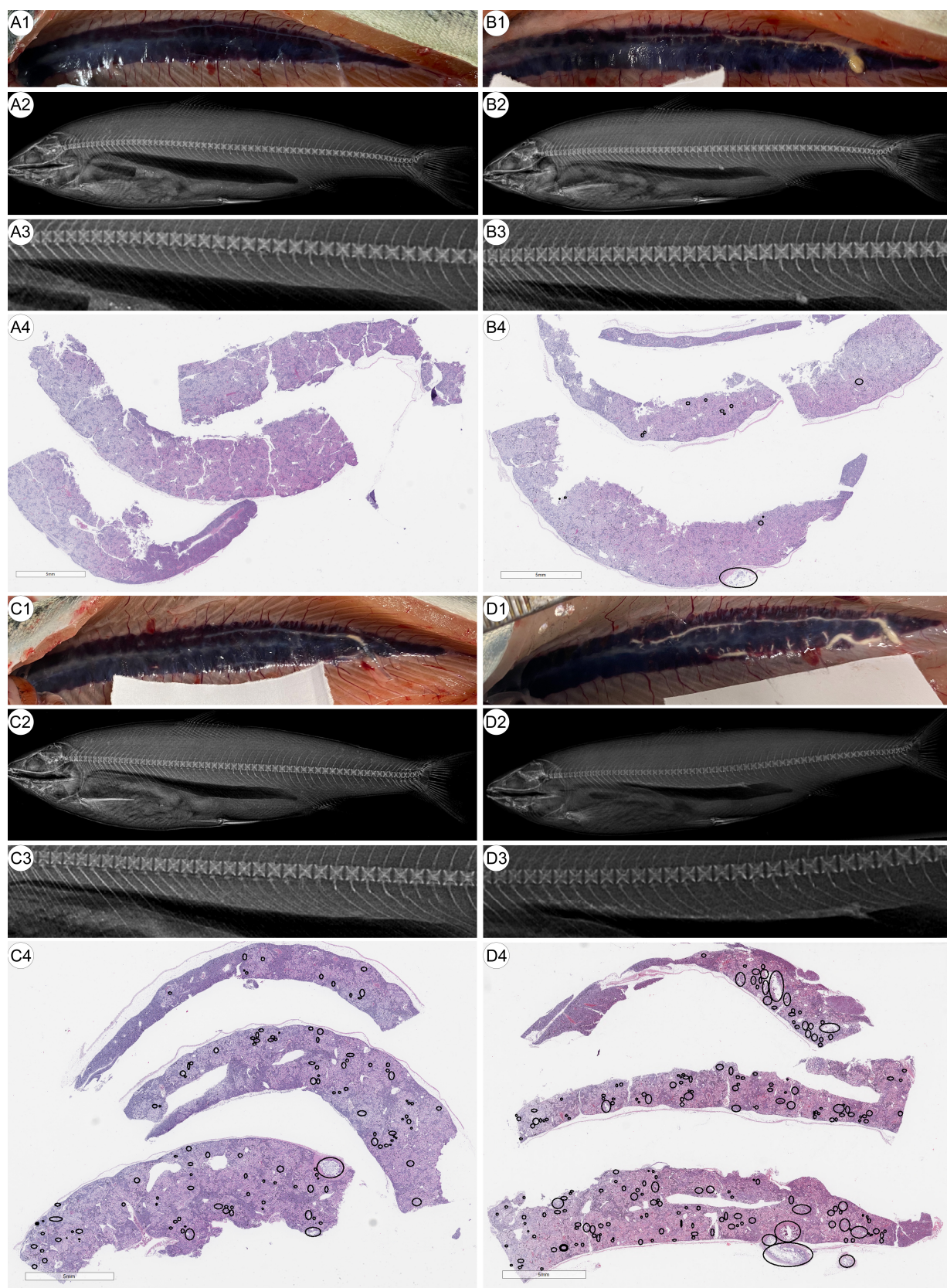
Det var en korrelasjon på 0.53 mellom den totale histologiskåren og røntgenvurderingen, noe som indikerer en moderat sammenheng (Yadav, 2018). Fisk diagnostisert som frisk på histologi



Figur 6.3: Røntgenvurdering av nefrokalsinose sammenliknet med vurdering på histologi. Sirkelstørrelse indikerer prosentamsvar mellom metodene.

ble vurdert som frisk eller med mild nefrokalsinose på røntgen (Fig.6.3). Tvert imot ble fisk diagnostisert med alvorlig nefrokalsinose på histologi vurdert med moderat eller alvorlig nefrokalsinose på røntgen.

Histologiskåren er en semikvantitativ skåringsmodell basert på endringer i nyrene i henhold til kjente prinsipper for patologi. Patologiske forandringer er delt inn i 4 underkategorier (tilstedeværelse av utfellinger, epiteldegenerasjon og/eller nekrose, patologiske endringer i glomeruli og patologiske endringer i interstitielt vev). Hver kategori er vektet etter effekten de forskjellige patologiske endringene antas å ha på utviklingen av tilstanden og tiden det vil ta å helbrede (Klykken et al., 2022a). Røntgen kan kun påvise den første kategorien i den histopatologiske skåringsmodellen, *dvs.* tilstedeværelsen av utfellinger, og vi forventet derfor noe variasjon mellom røntgenvurderingen og den histologiske skåren. Begge metodene er semikvantitative og kan påvirkes av observatøren, skåringen av nefrokalsinose bør derfor forbedres ytterligere ved å implementere maskinlæring for begge metodene.



Figur 6.4: Eksempel på makroskopisk presentasjon (1), røntgenbilde (2 (hel fisk) and 3 (nyreregion)) and histologi (4 (hele nyre fra anterior til posterior del; regioner med forandringer assosiert med nefrokalsinose er vist med sort ellipse), fra normal fisk (A) og fisk med ulike grader av nefrokalsinose fra mild (B), moderat (C) til alvorlig (D) vurdert med røntgen og histologi.

KONKLUSJONER OG VEIEN VIDERE

I prosjektet har vi fått bekreftet at nefrokalsinose er en utbredt produksjonslidelse med alvorlige konsekvenser for velferd og overlevelse hos oppdrettslaks. Nefrokalsinose er beskrevet som en utfelling av mineralutfellinger i nyretubuli og urinlederen og/eller samlerør. Denne studien har derfor fokusert på å identifisere mineralene i nyrene. Næringsaktører rapporterer derimot at fisk med nefrokalsinose ofte har forkalkninger i blant annet øye, pseudobrankie, hjerteklaff og tarmvegg. Den mulige sammenhengen mellom forkalkning i ulike vev kan ha ytterligere konsekvenser for fiskens helse og velferd og bør studeres i videre forskning.

Denne studien fant at suboptimal vannkvalitet er den mest sannsynlig risikofaktor for nefrokalsinose. Vi foreslår at tilsetning av sjøvann for tidlig i produksjon utsetter fisken for osmoregulatorisk stress, som igjen fører til utfelling av mineraler i nyrene. Resultatene våre viste at hyperkalsemi er tett relatert til nefrokalsinose. Kortvarig hyperkalsemi er naturlig i anadrom fisk når de vandrer fra ferskvann til sjøvann. Laksen kompenserer raskt for den økte tilgangen til kalsiumioner ved å redusere opptak over gjeller og øke utskillelse over nyrene (osmoregulering), og homeostase er vanligvis oppnådd i løpet av 2 uker. I settefiskanlegg, fant vi indikasjon på at fisken som er utsatt for nefrokalsinose har hyperkalsemi over lenger tid. En mulig årsak kan være at fisken er eksponert for økte konsentrasjoner av ioner for tidlig i produksjonen, det vil si før den er smoltifisert, og ikke i stand til å håndtere den økte tilgangen. Den gradvis økning av salinitet, som enkelte anlegg gjennomfører kan også være en risikofaktor, siden den fører til at fisken stadig må justere opptak og utskillelse av ioner.

Studien fokuserte ikke på genetisk predisposisjon for nefrokalsinose. Det ble derimot funnet fisk med nefrokalsinose i alle settefiskanleggene i kartleggingsundersøkelsen. I tillegg rapporteres det av næringsaktører at nefrokalsinose kan oppstå allerede i fisk på 5 g. Det kan tyde på at oppdrettslaks er predisponert for tilstanden, men at suboptimal vannkvalitet øker prevalens og alvorlighetsgrad i fiskegruppa. Vi anbefaler å gjennomføre rutinemessig oppfølging av nefrokalsinose i settefiskfasen, for å kunne avdekke kritiske faser i produksjonen. Røntgen vil kunne benyttes for oppfølging av fisken uten å måtte avlive den. Videre anbefaler vi å nøye vurdere timing på sjøvannstilsetning dersom det skal benyttes, og sørge for at dette samsvarer med andre smoltifiserings-signaler som gis i produksjonen i eget anlegg.

Takk til

Vi vil gjerne rette en stor takk til alle anlegg som har deltatt i prosjektet. En spesiell takk til driftsledere, driftspersonell og fiskehelsepersonell hos SinkabergHansen AS, MOWI ASA, Neptune settefisk AS, Salmonor AS, Flatanger settefisk AS, Åsen settefisk AS, Lerøy AS, SalMar ASA og Bremnes Seashore AS.

Vi takker også for godt samarbeid med Anne K. Reed (Pharmaq Analytiq AS), Alf S. Dalum (PatoGen AS), Paul Whatmore (Queensland Univesity of Technology), Morten K. Moe (Füerst) og Essa A. Khan (NTNU).

Videre ønsker vi å takke Kari Attramadal og Rolf E. Olsen ved NTNU for god faglig veiledning av stipendiat Christine Klykken (Aqua Kompetanse AS).

Til slutt takker vi gode kollegaer i Aqua Kompetanse for uvurderlig bistand i arbeidet; Liss Lunde, Adina Svedberg, Erlend Solem, Susanne Tofte, Alexander Figenschou, Camilla Karlsen, Anja Hervik og Torolf Storsul.

Studien ble finansiert av FHF og Norges forskningsråd.

LEVERANSER

Alle leveransene i NEFROSMOLT prosjektet er oppsummert nedenfor.

Medieomtale

Forsker på nedsatt nyrefunksjon hos fisk - Publisert 11.2019

Boissonnot L., Klykken C.

Kyst : <https://www.kyst.no/fhf/forsker-pa-nedsatt-nyrefunksjon-hos-fisk/505423>

Nye prosjekter på nefrokalsinose og hemoragisk smoltsyndrom - Publisert 12.2019

Jørgensen S.M.

FHF : <https://www.fhf.no/nyheter/nyhetsarkiv/nye-prosjekter-paa-nefrokalsinose-og-hemoragisk-smoltsyndrom/>

Populærvitenskapelige artikler

Forekomst av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i Midt-Norge - Publisert desember 2020

Klykken K., Boissonnot L., Lunde L., Stensby-Skjærvik S.

Norsk Fiskeoppdrett : <https://www.kyst.no/nefrokalinose-ras-settefisk/har-kartlagt-utbredelse-av-nefrokalsinose/332984>

Incidence of nephrocalcinosis in Norwegian farmed salmon - Publisert juli 2021

Klykken C., Boissonnot L., Lunde L., Stensby-Skjærvik S.

Info-RAS : <https://info-ras.cl/wp-content/uploads/2021/07/Aqua-Komeptanse-Incidence-of-nephrocalcinosis-in-Norwegian-farmed-salmon.pdf>

Rapport

Delrapport for NEFROSMOLT: Nefrokalsinose hos laksesmolt - en kartleggingsundersøkelse med fokus på risikofaktorer. FHF-901587 - Publisert mars 2021

Boissonnot L., Klykken C., Stensby-Skjærvik S.

FHF : <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901587/>

***Webinar Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt - Organisert desember 2020**

Boissonnot L., Klykken C.

Aqua Kompetanse : <https://aqua-kompetanse.no/streaming/>

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt - Organisert juni 2022

Boissonnot L., Stensby-Skjærvik S., Klykken C.

Camerat : <https://camerat.no/webinar-nefrosmolt/>

Foredrag

Risikofaktorer for nefrokalsinose, foreløpige data - Presentert desember 2020

Klykken C., Boissonnot L., Lunde L., Stensby-Skjærvik S.

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt, Aqua Kompetanse

Utbredelse av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i Midt-Norge - Presentert desember 2020

Boissonnot L., Klykken C., Lunde L., Stensby-Skjærvik S.

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt (digitalt)

Er nefrokalsinose en bidragsyter til dødelighet hos lak? - Presentert februar 2021

Klykken, C., Boissonnot, L., Lunde, L., Stensby-Skjærvik, S.

Tekset 2021 (digitalt)

Nefrokalsinose – hva, hvorfor og hvordan? - Presentert mai 2022

Klykken, C., Reed A. K., Dahum A. S., Olsen R. E., Moe M. K., Whatmore, P., Attramadal K., J. K. Boissonnot L.

Frisk Fisk, Bergen

Velkommen til webinar, hva har skjedd siden sist? - Presentert juni 2022

Boissonnot L., Stensby-Skjærvik S., Klykken C., Lunde L.

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt (digitalt)

Nefrokalsinose og sjø- vannstilsetning - en sammenheng? - Presentert juni 2022

Klykken C., Boissonnot L., Lunde L., Stensby-Skjærvik S.

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt (digitalt)

HSS - Presentert juni 2022

Lunde L., Klykken C., Boissonnot L., Stensby-Skjærvik S.

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt (digitalt)

Røntgendiagnostikk av nefrokalsinose - Presentert juni 2022

Klykken C., Boissonnot L., Lunde L. Stensby-Skjærvik S.

Fagwebinar Nefrokalsinose hos laksesmolt (digitalt)

Physiological changes observed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with nephrocalcinosis - Planlagt presentert september 2022

Klykken C., Reed A. K., Dalum A. S., Olsen R. E., Moe M. K., Attramadal K. J. K., Boissonnot L.

Aquaculture Europe 2022, Rimini, Italia

Vitenskapelige artikler

Physiological changes observed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with nephrocalcinosis - Publisert mai 2022

Klykken C., Reed A. K., Dalum A. S., Olsen R. E., Moe M. K., Attramadal K. J. K., Boissonnot L.

Aquaculture : <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738104>

Gene expression patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with severe nephrocalcinosis - Akseptert juni 2022

Klykken C., Boissonnot L. , Reed A. K., Whatmore, P., Attramadal K. J. K., Olsen R. E.

Journal of Fish Diseases

X-ray detection of nephrocalcinosis in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. - Under peer-review (sendt juni 2022)

Klykken C., Dalum A. S., Reed A. K., Attramadal K. J. K., Olsen R. E., Boissonnot L.

Journal of Fish Diseases

Nephrocalcinosis in farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) associated with salinity fluctuations: A case report. - Under utarbeidelse

Klykken, C., Khan, E.A., Reed, A.K., Whatmore, P., Attramadal, K. J. K., Olsen, R.E., Boissonnot, L.

Planlagt sendt til Aquaculture

REFERANSER

- Attramadal K. (2020) Vannkvalitet med fokus på sjøvann og fiskehelse. Presentasjon under webinar for nefrokalsinose hos laksesmolt. Digitalt.
- Bakke, H., Bjerknes, V., Øvreeide, A., 1991. Effects of rapid changes in salinity on the osmoregulation of postsmolt atlantic salmon (*salmo salar*). *Aquaculture* 96, 375–382. doi:10.1016/0044-8486(91)90166-5
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57:289–300
- Bijvelds M. J. , Velden J. A. V. D., Kolar Z. I., and Flik G. (1998) Magnesium transport in freshwater teleosts, *Journal of Experimental Biology* 201:1981–1990.
- Bjerknes V., Lydersen E., Golmen LG., Hobæ, A., Holtet L. (1994) Nefrokalsinose hos regnbueørret i oppdrettsanlegg ved Trengereid. Miljømessige årsaker. NIVA-rapport O-93249. 31 pp.
- Brás LP., Bernardino SA., Lopes JA., Menezes JC (2005) Multiblock PLS as an approach to compare and combine NIR and MIR spectra in calibrations of soybean flour. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 75, 91-99.
- Brett, J. R. (1971). Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) *American Zoologist* 11, 99–113.
- Bruno DW. (1996) Nephrocalcinosis. *Aquaculture Information Series*. Marine Laboratory, Aberdeen, 16, 1-5.
- Bruno, D.W., Noguera, P.A., Poppe, T.T. (2013) Idiopathic Diseases, in: *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. 1 ed.. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 179–185. doi:10.1007/978-94-007-2010-7-11.
- Cardeilhac, P. T., Simpson, C. F., Lovelock, R. L., Yosha, S. F., Calderwood, H. W., Gudat, J. C. (1979). Failure of osmoregulation with apparent potassium intoxication in marine teleosts: A primary toxic effect of copper. *Aquaculture*, 17(3), 231– 239. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90126-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90126-1)
- Carey J. B. and McCormick S. D. (1998) Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr, *Aquaculture* 168:237–253. doi:10.1016/S0044-8486(98)00352-4.
- Chen CY., Wooster GA., Getchell RG., Bowser PR., Timmons MB. (2001) Nephrocalcinosis in Nile

- Tilapia from a Recirculation Aquaculture System: A Case Report. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 368-372.
- Claireaux, G. Lagardere, J. P. (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research* 42, 157–168. doi: 10.1016/S1385-1101(99)00019-2
- Conceição, N., Laizé, V., Simões, B., Pombinho, A.R., Cancela, M.L., 2008. Retinoic acid is a negative regulator of matrix gla protein gene expression in teleost fish *Sparus aurata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1779, 28–39. doi:10.1016/j.bbarm.2007.11.003.
- Dominguez FJ, Pontigo JP, Oyarzun R, Vargas-Lagos C, Morera FJ, Vargas-Chacoff L (2019) The expression pattern of calcium signaling-related genes during smoltification of *Salmo salar* in productive conditions. *Comp Biochem Phys B* 231:20–25
- Drábiková, L., Fjelldal, P. G., Clercq, A. D., Yousaf, M. N., Morken, T., McGurk, C., and Witten, P. E. (2021). Vertebral column adaptations in juvenile atlantic salmon *Salmo salar*, l. as a response to dietary phosphorus. *Aquaculture*, 541:736776.
- Damsgård B., Bjørklund F., Johnsen HK., Toften H. (2011) Short- and long-term effects of fish density and specific water flow on the welfare of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 322-323, 184-190.
- Davies M. (2016) Veterinary clinical nutrition: success stories: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1-6.
- Duston J. (1994) Effect of salinity on survival and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and smolts, *Aquaculture*, 121, 115-124.
- Duston, J., Saunders, L. (1990). The entrainment role of photoperiod on hypoosmoregulatory and growth-related aspects of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology*, 68, 707–715
- Fikri A., Recai T., Hijran YY., Oguz K. (2000) Nephrocalcinosis in intensively reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah* 52, 111-117.
- Fivelstad S. (2013) Long-term carbon dioxide experiments with salmonids. Review. *Aquaculture engineering* 53, 40-48.
- Fivelstad S, Haavik H, Løvik G Olsen AB (1998). Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. *Aquaculture* 160, 305-316.
- Fivelstad S., Hosfeld C., Handeland S., Terjesen BF. Kvamme K. (2015b) Sluttrapport for Post-smolt D: Grenseverdier for karbondioksid for postsmolt. Høgskolen i Bergen. FHF-prosjekt 900895, 34 pp.
- Fivelstad S., Hosfeld CD., Medhus RA., Olsen A. Kvamme K. (2018) Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures. *Aquaculture* 482, 83-89.
- Fivelstad S., Olsen AB., Asgard T., Baeverfjord G., Rasmussen T., Vindheim T. Stefansson S. (2002) Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture* 215, 301-319.
- Fivelstad S., Olsen AB., Kløften H., Ski H. Stefansson S. (1999) Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture* 178, 171-187.
- Fivelstad S., Waagbø R., Zeitz SF., Hosfeld ACD., Olsen AB. Stefansson S. (2003) A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture* 215, 339-357.
- Flik, G., Rijs, J.V., Bonga, S.E.W., 1984. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus.

- European Journal of Biochemistry 138, 651– 654.
- Folmar, L.C., Dickhoff, W.W. (1980) The parr—Smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids. *Aquaculture* 21,597 1–37. doi:10.1016/0044-8486(80)90123-4.
- Friedrichs K.R., Harr K. E., Freeman K.P., Szladovits B., Walton R.M., Barnhart K.F. and Blanco-Chavez J., (2012) Asvcp reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics, *Veterinary Clinical Pathology* 41:441–453. doi:10.1111/vcp.12006.
- Gambaro G., Trinchieri A. (2016) Recent advances in managing and understanding nephrolithiasis/nephrocalcinosis. *F1000 Research* 695, 1-8.
- Gillespie DC. Evans RE. (1979) Composition of granules from kidneys of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with nephrocalcinosis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36, 683-685.
- Good C., Davidson J., Terjesen BF., Takle H., Kolarevic J. Bæverfjord G. (2018) The effects of long-term 20 mg/L carbon dioxide exposure on the health and performance of Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolt in water recirculation aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 81, 1-9.
- Good C., Davidson J., Welsh C., Snekvik K. Summerfelt S. (2010) The effects of carbon dioxide on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water recirculation aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 42, 51-56.
- Grauer GF. (2009) Part five - Urinary tract disorders. In Nelson R.W., Couto C.G. (Ed.) *Small animal internal medicine - 4th edition*, 2009. 607-694.
- Hicks BD., Hilton JW. Ferguson HW. (1984) Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 7, 379-389.
- Hjeltnes B., Jensen BB., Bornø G., Haukaas A. Walde CS. (2019) Fiskehelse rapporten 2018. Veterinærinstituttets rapportserie nr 6a/2019, 132 pp.
- Holm, H., Ytteborg, E., Høst, V., Reed, A. K., Dalum, A. S., and Bæverfjord, G. (2020). A pathomorphological description of cross-stitch vertebrae in farmed atlantic salmon (*salmo salar* l.). *Aquaculture*, 526:735382.
- Hosfeld CD., Engevik A., Mollan T., Lunde TM., Waagbø R., Olsen AB., Breck O., Stefansson S. Fivelstad S. (2008) Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 280, 146-153.
- Ikura, M., Ames, J.B., (2006) Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: Two ways to promote multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 1159–1164. doi:10.1073/pnas.0508640103
- Iversen M. and Eliassen R.A. (2009) The effect of aqui-s® sedation on primary, secondary, and tertiary stress responses during salmon smolt, *salmo salar* l., transport and transfer to sea. *Journal of the World Aquaculture Society* 40:216–225. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00244.x>
- Khan JR., Johansen D. Skov PV. (2018) The effects of acute and long-term exposure to CO₂ on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater. *Aquaculture* 491, 20-27.
- Klosterhoff M., Pedrosa V., Sampaio LA., Ramos L., Tesser MB. Romano, LA. (2015) Nephrocalcinosis and kidney stones in *Tachycentron canadum*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 35, 138-147.
- Klykken, C., Reed, A., Dalum, A., Olsen, R., Moe, M., Attramadal, K., and Boissonnot, L. (2022a). Physiological changes observed in farmed atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with nephrocalcinosis. *Aquaculture*, 554:738104
- Klykken, C., Dalum, AS., Reed, AK., Attramadal, KJK., Olsen, RE., Boissonnot, L. (2022b) X-ray detection of nephrocalcinosis in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. Sendt til *Journal of Fish Diseases*.

- Klykken, C., Boissonnot, L., Reed, A.K., Whatmore, P., Attramadal, K. J. K., Olsen, R.E.(2022c) Gene expression patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with severe nephrocalcinosis. Sendt til Journal of Fish Diseases.
- Knox D., Cowey CB. Adron, JW. (1981) Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition 45, 137-148.
- Krasnov, A., Sommerset, I., Sjøfteland, T., Afanasyev, S., Boysen, P., Lund, H. (2020) Consequences of haemorrhagic smolt syndrome (HSS) for the immune status of atlantic salmon (*salmo salar* L.) (case study). Biology 9: 1–12. doi:10.3390/biology9010001.
- Lewisch E., Kucera M., Tappert R., Tessadri R., Tappert M. Kanz F. (2013) Occurrence of nephrocalcinosis in a population of longsnout seahorse, *hippocampus reidi* Ginsburg, and analysis of a nephrolith. Journal of Fish Diseases 36, 163-167.
- Lulich JP., Osborn CA., Thumchai R., Lekcharoensuk C., Ulrich LK., Koehler LA., Bird KA., Swanson LL. Nakagawa Y. (1999) Epidemiology of canine calcium oxalate uroliths. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 29, 113-22.
- Løvmo, S. D., Whatmore, P., Sundh, H., Sigholt, T., Madaro, A., Bardal, T., and Olsen, R. E. (2021). Effects of atlantic salmon (*salmo salar*) fed low- and high hufa diets on growth and midgut intestinal health. Aquaculture, 539:736653.
- Matsche M.A., Arnold J., Jenkins E., Townsend H. and Rosemary K. (2014) Determination of hematology and plasma chemistry reference intervals for 3 populations of captive atlantic sturgeon (*acipenser oxyrinchus oxyrinchus*), Veterinary Clinical Pathology 43:387–396.
- Mortensen, A., Damsgård, B., 1998. The effect of salinity on desmoltification in atlantic salmon. Aquaculture 168, 407–411. doi:10.1016/S0044- 8486(98)00366-4
- Mota VC., Nilsen TO., Gerwins J., Gallo M., Ytteborg E., Baeverfjord G., Kolarevic J., Summerfelt ST. Terjesen BF. (2019) The effects of carbon dioxide on growth performance, welfare, and health of Atlantic salmon post-smolt (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems. Aquaculture 498, 578-586.
- Nieves-Puigdoller, B. T. Björnsson, S. D. McCormick (2007) Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in atlantic salmon, Aquatic Toxicology 84:27–37. doi:10.1016/j.aquatox.2007.05.011.
- Noble C., Gismervik K., Iversen MH., Kolarevic J., Nilsson J., Stien LH. Turnbull JF. (2018) Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare.
- Nylund A., Plarre H., Hodneland K., Devold M., Aspehaug V., Aarseth M., Koren C. Watanabe K. (2003) Haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in Norway: pathology and associated virus-like particles. Diseases of Aquatic Organisms 54, 15-27.
- Olsen AB., Bornø G., Colquhoun D., Flesjå K., Haldorsen R., Mo TA., Nilsen H., Skjelstad HR. Hjeltne B. (2006) Helsenhetssituasjonen hos oppdrettsfisk 2006. Veterinærinstituttet, 20pp.
- Olszynski, M., Prywer, J., Torzewska, A., 2015. Effect of Size and Shape of Nanosilver Particles on Struvite and Carbonate Apatite Precipitation. Crystal Growth and Design 15, 3307–3320. doi:10.1021/acs.cgd.5b00425
- Osborne CA., Klausnes J. Lulich, JP. (1995) Canine and Feline Calcium Phosphate Uroliths, Current Veterinary Therapy XII, 996–1001.
- Osborne CA., Lulich JP., Kruger JM., Ulrich, LK. Koehler LA. (2009) Analysis of 451, 891 canine uroliths, feline uroliths, and feline urethral plugs from 1981 to 2007: Perspectives from the Minnesota Urolith Center, Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice 39(1),183–197.
- Ou, X., Chen, X., Xu, X., Xie, L., Chen, X., Hong, Z., Bai, H., Liu, X., Chen, Q., Li, L., and Yang, H. (2021). Recent development in x-ray imaging technology: Future and challenges. Research, 2021:1–18.

- Peres H., Costas B., Perez-Jimenez A., Guerreiro I. and Oliva-Teles A. (2015) Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of senegalese sole (*solea senegalensis* kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions, *Journal of Applied Ichthyology* 31:65–71. <https://doi.org/10.1111/jai.12641>
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Phillips JC., Bex C., Mendis D. Gangolli SD. (1986) Studies on the mechanism of diet-induced nephrocalcinosis: calcium and phosphorus metabolism in the female rat. *Food and Chemical Toxicology* 24, 283–288.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://R-project.org>.
- Rodger HD. Richards RH. (1998) Haemorrhagic smolt syndrome: a severe anaemic condition in farmed salmon in Scotland. *Veterinary Record* 142, 538–541.
- Roy, P.K., Lall, S.P., 2004. Urinary phosphorus excretion in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.) and Atlantic salmon, *Salmo salar* (L.). *Aquaculture* 233, 369–382. [doi:10.1016/j.aquaculture.2003.09.041](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.041)
- Sandnes K., Lie O. and Waagbo R., (1988) Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed atlantic salmon, *salmo salar*, *Journal of Fish Biology* 32:129–136. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05341.x>
- Sayer JA., Carr G. Simmons NL. (2004) Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clinical Science* 106, 549–561.
- Schlotfeldt HJ. (1981) Some clinical findings of a several years survey of intensive aquaculture systems in northern Germany, with special emphasis on gill pathology and nephrocalcinosis. In: Tiews K. (Ed.), *Proc. World Symp. on Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems* vol. I, pp. 109–119. Berlin.
- Shavit L., Jaeger P. Unwin RJ. (2015) What is nephrocalcinosis? *Kidney International* 88, 35–43.
- Smart GR., Knox D., Harrison JG. , Ralph JA., Richards RH. Cowey CB. (1979) Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri Richardson*; the effect of exposure to elevated CO₂ concentrations. *Journal of Fish Diseases* 2, 279–289.
- Smedley, M., Migaud, H., McStay, E., Clarkson, M., Bozzolla, P., Campbell, P., and Taylor, J. (2018). Impact of dietary phosphorous in diploid and triploid atlantic salmon (*salmo salar* l.) with reference to early skeletal development in freshwater. *Aquaculture*, 490:329–343.
- Smith, J. P. and Lehr, J. R. (1966). X-ray investigation of carbonate apatites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14:342–349.
- Sommerset I, Walde C S, Bang Jensen B, Wiik-Nielsen J, Bornø G, Oliveira VHS, Haukaas A og Brun E. Fiskehelserapporten 2021, Veterinærinstituttets rapportserie nr. 2a/2022, utgitt av Veterinærinstituttet 2022
- Stark R., Grzelak M. Hadfield, J. (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nature Review Genetics* 20, 631–656.
- Sundell K, Bjornsson BTh, Itho Fl, Kawauchi H. (1992) Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calciumuptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol B* 162: 489—495
- Sæther PA. (2019) Marine Helse - fisken i fokus. Presentasjon på TEKSET 2019, Clarion Hotel og Congress Trondheim, Norge.
- Thomsen, HM. (2019) Forekomst av nefrokalsinose hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*); et klinisk studie, Fordypningsoppgave, Norwegian University of Life Sciences. 58 pp.
- Tion MT., Dvorska J. Saganuwan SA. (2015) A review on urolithiasis in dogs and cats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 18, 1–18.

- Thrush, M. N., Duncan, N. L., Bromage, N. R. (1999). The use of photoperiod in the production of out-of season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 121, 29–44
- Urke, H.A., Arnekleiv, J.V., Nilsen, T.O., Nilssen, K.J., Rønning, L., Ulvund, J.B. and Kristensen, T. (2014). Long-term hypo-osmoregulatory capacity in downstream migrating Atlantic salmon *Salmo salar* L. smolts. *J Fish Biol*, 85: 1131-1144. <https://doi.org/10.1111/jfb.12508>
- Vezzoli G., Terranegra A., Arcidiacono T. Soldati L. (2011) Genetics and calcium nephrolithiasis. *Kidney International* 80: 587-593.
- Vielma J. and Lall S.P. (1998) Control of phosphorus homeostasis of atlantic salmon (*salmo salar*) in fresh water, *Fish Physiology and Biochemistry* 19:83–93.
- Wagner GF. (1993) Stanniocalcin: structure, function and regulation. In: Hochachka PW, Mommsen TP (eds). *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 2: 419—434
- Wagner GF, Jaworski EM, Haddad M. Stanniocalcin in the seawater salmon: structure, function, and regulation. *Am J Physiol*. 1998;274(4):R1177–1185. doi:10.1152/ajpregu.1998.274.4.R1177
- Weichert, F.G., Ax en, C., F orlin, L., Inostroza, P.A., Kammann, U., Welling, A., Sturve, J., Asker, N. (2021) A multi-biomarker study on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by the emerging Red Skin Disease in the Baltic Sea. *Journal of Fish Diseases* 44:429–440. doi:10.1111/jfd.13288.
- Wongdee, K., Charoenphandhu, N. (2013) Regulation of epithelial calcium transport by prolactin: From fish to mammals. *General and Comparative Endocrinology* 181, 235–240. doi:10.1016/j.ygcen.2012.07.006.
- Woo PTK. Bruno DW. (2014) *Diseases and disorders of finfish in cage culture*. CABI (2nd edition). 354 pp.
- Xiong Y., Huang M. Zhou Y. (2020) Growth, osmoregulation and energy budget of rainbow and steelhead trout under different salinity acclimation methods and the best transition size of steelhead trout. *Aquac Res*. 2020; 51: 2369– 2378.
- Yadav, S. (2018). Correlation analysis in biological studies. *Journal of the Practice of Cardiovascular Sciences*, 4:116.

VEDLEGG

Tabell V1: Statistisk forskjell i alvorlighetsgrad av nefrokalsinose mellom fisk fra ulike settefiskanlegg (anleggene 1 til 12). p < 0,001: ‘***’; p < 0,01: ‘**’; p < 0,05: ‘*’; p > 0,05: ‘.’

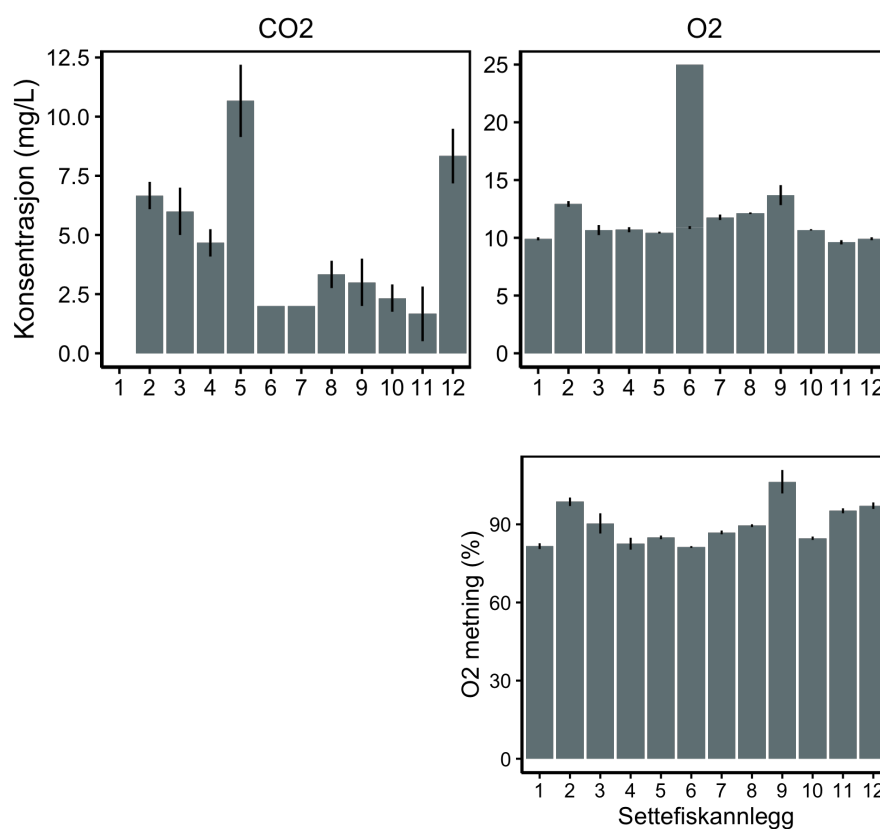
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	.										
3	***	***									
4	***	***	***								
5	.	.	***	***							
6	***	***	.	***	***						
7	***	***	.	***	***	.					
8	**	***	*	***	**		***				
9	.	.	***	***	.	***	***	***			
10	.	.	***	***	.	***	***	*	.		
11	***	***	.	***	***	.	.	.	***	***	
12	.	.	***	***	.	***	***	**	.	.	***

Tabell V2: Statistisk forskjell i alvorlighetsgrad av nefrokalsinose mellom fisk fra ulike matfiskanlegg (anleggene 1 til 12). $p < 0,001$: ‘***’; $p < 0,01$: ‘**’; $p < 0,05$: ‘*’; $p > 0,05$: ‘.’

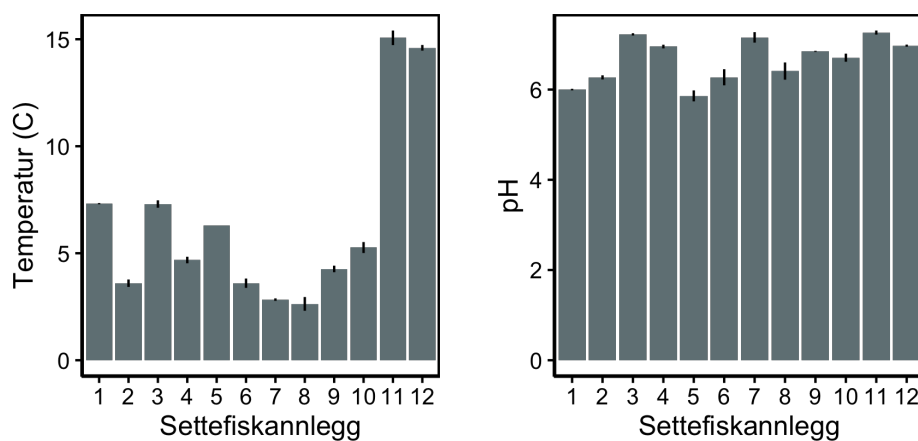
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	.										
3	.	.									
4	***	***	.								
5	.	.	***	.							
6	**	.	***	**	.						
7	.	.	***	.	.	.					
8	.	.	***	.	**	.	.				
9	.	.	***	.	*	.	.	.			
10	.	.	***	.	.	.	.	.	.		
11	.	.	***	.	.	.	.	.	.	.	
12	.	.	***	.	*	.	.	.	.	.	.

Tabell V3: Statistisk forskjell i skadekategorier mellom fisk med nefrokalsinose fra ulike settefiskanlegg (anleggene 1 til 12). $p < 0,001$: ‘***’; $p < 0,01$: ‘**’; $p < 0,05$: ‘*’; $p > 0,05$: ‘.’

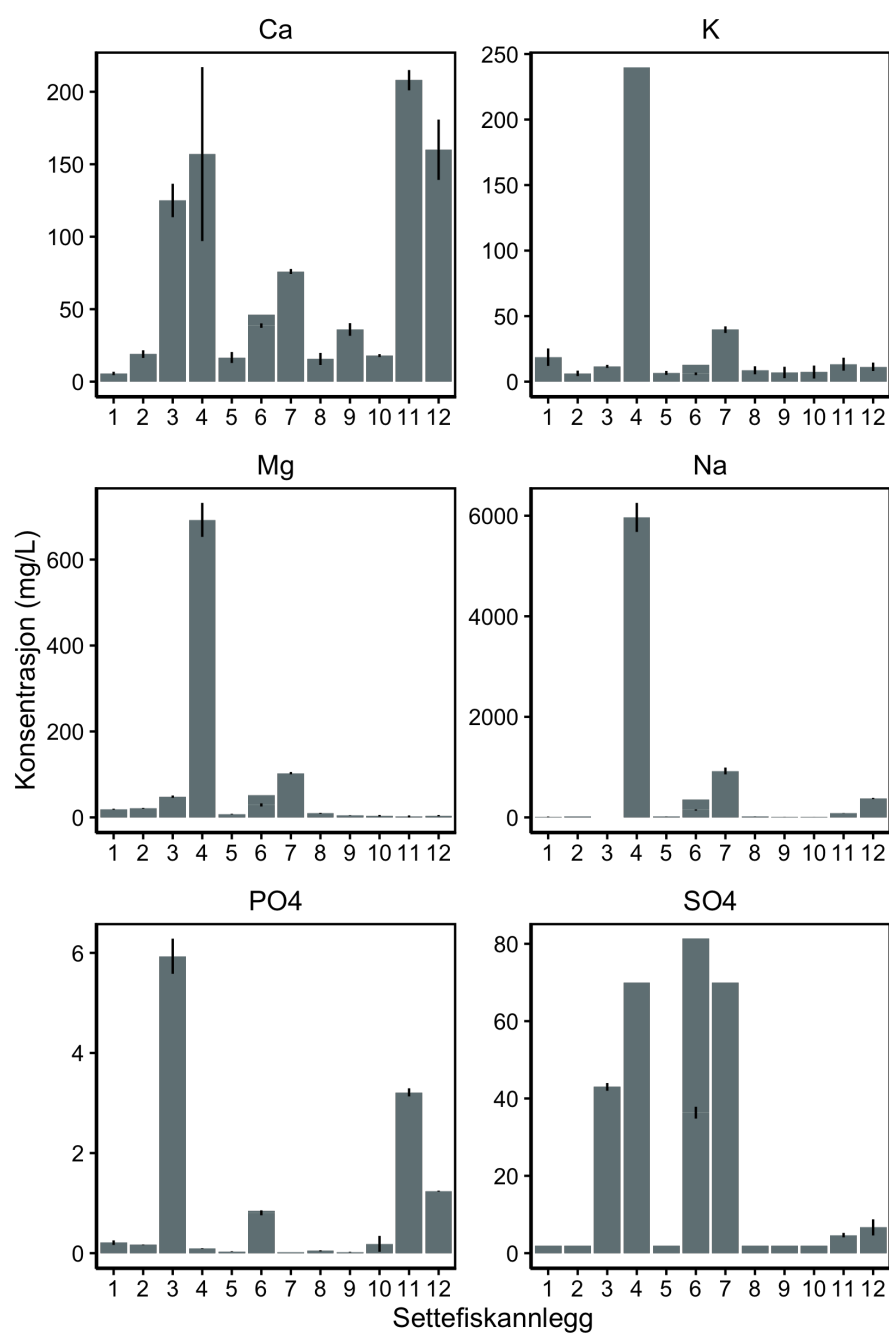
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	.										
3	***	***									
4	***	***	***								
5	.	.	***	***							
6	***	***	.	***	***						
7	***	***	.	***	***	.					
8	**	***	.	***	**	*	***				
9	.	.	***	***	.	***	***	***			
10	.	.	***	***	.	***	***	*	.		
11	***	***	.	***	***	.	.	.	***	***	
12	.	.	***	***	.	***	***	**	.	.	***



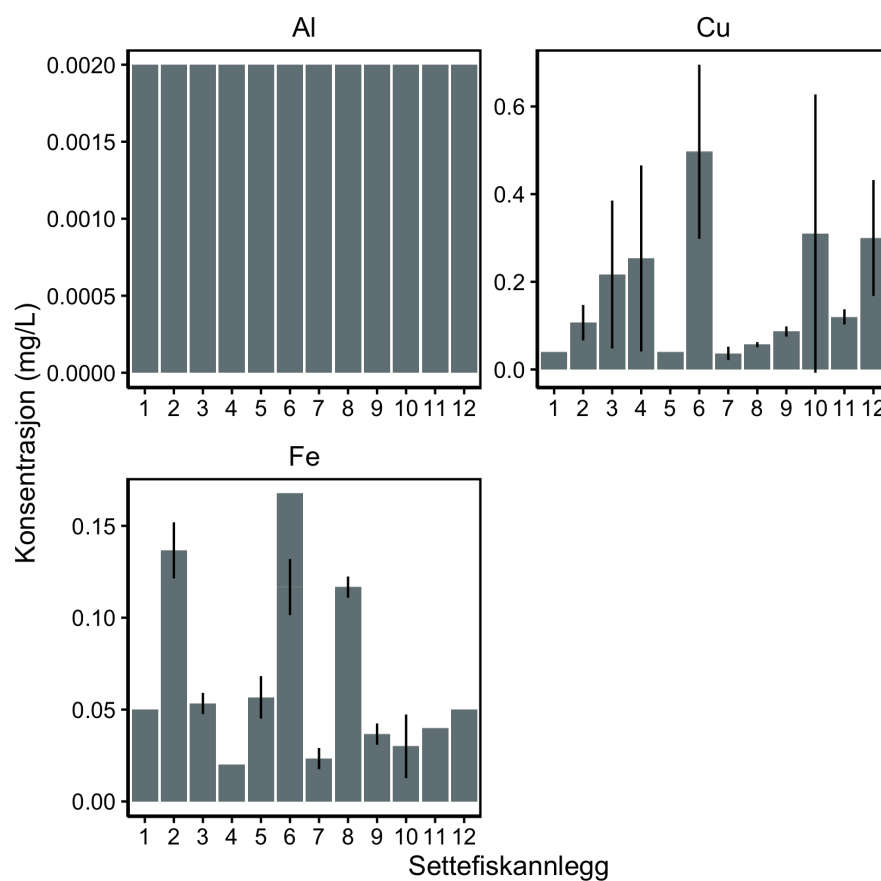
Figur V1: CO₂ og O₂ konsentrasjoner og O₂ metning i vann i de ulike settefiskanleggene.



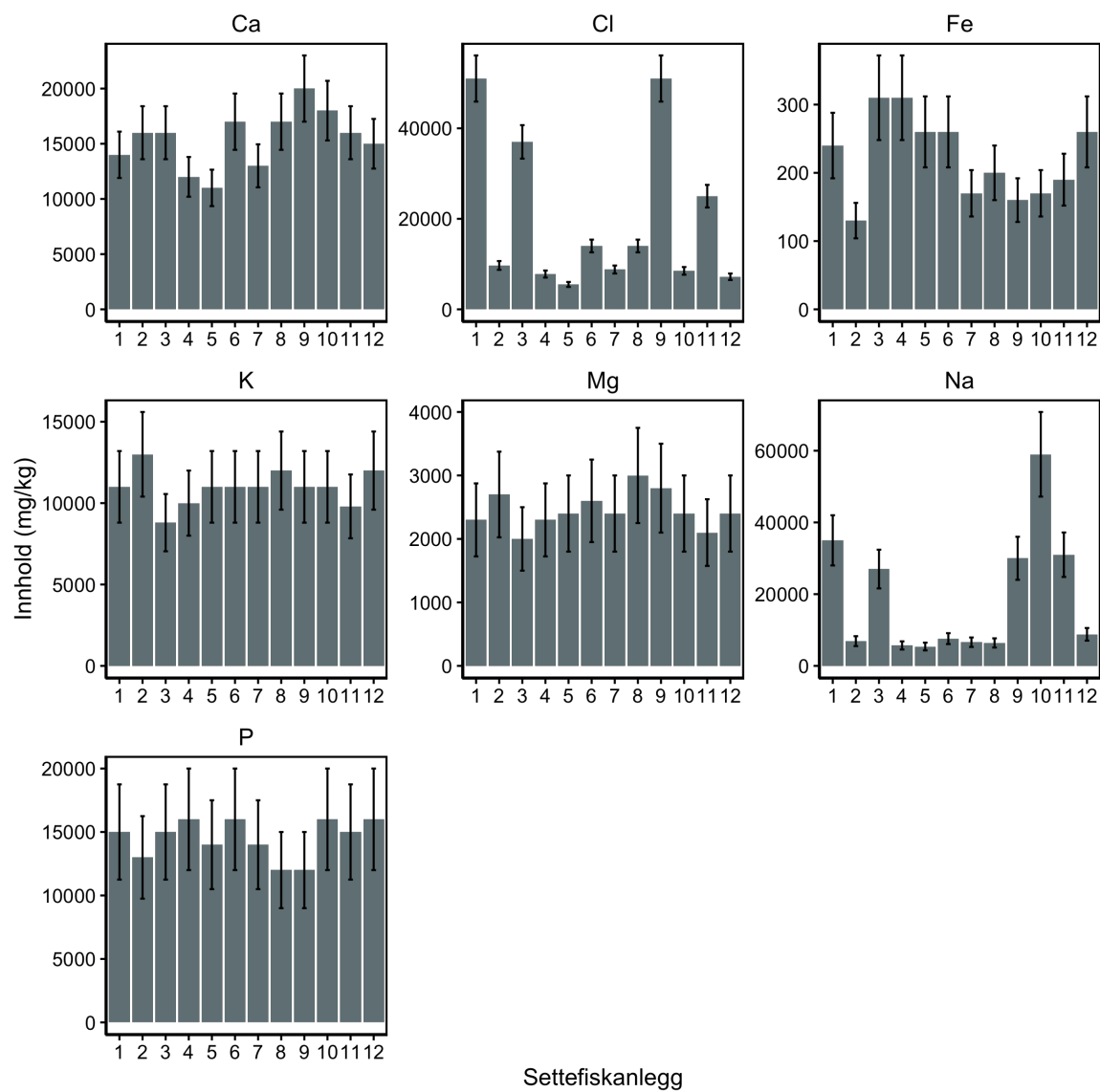
Figur V2: Temperatur og pH i vann i de ulike settefiskanleggene.



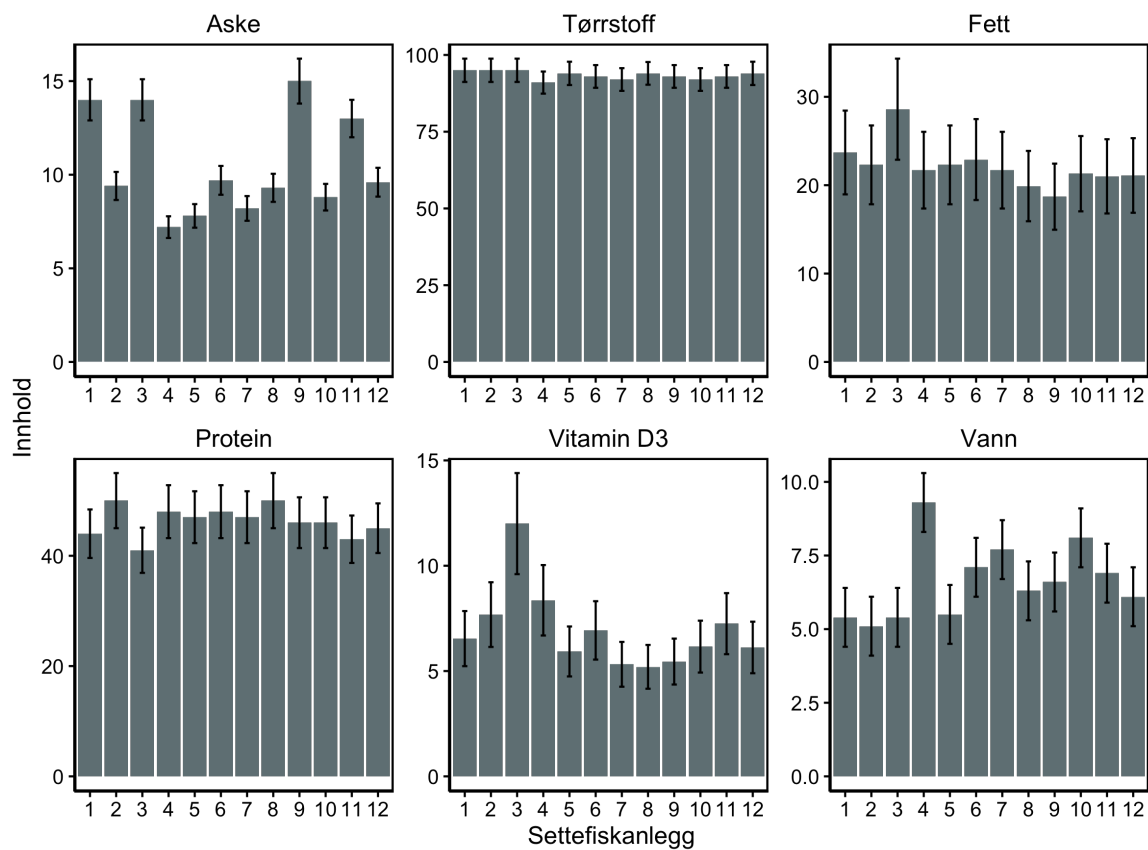
Figur V3: Konsentrasjoner av ioner (kalsium, kalium, magnesium, natrium, fosfat og sulfat) i vann i de ulike settefiskanleggene.



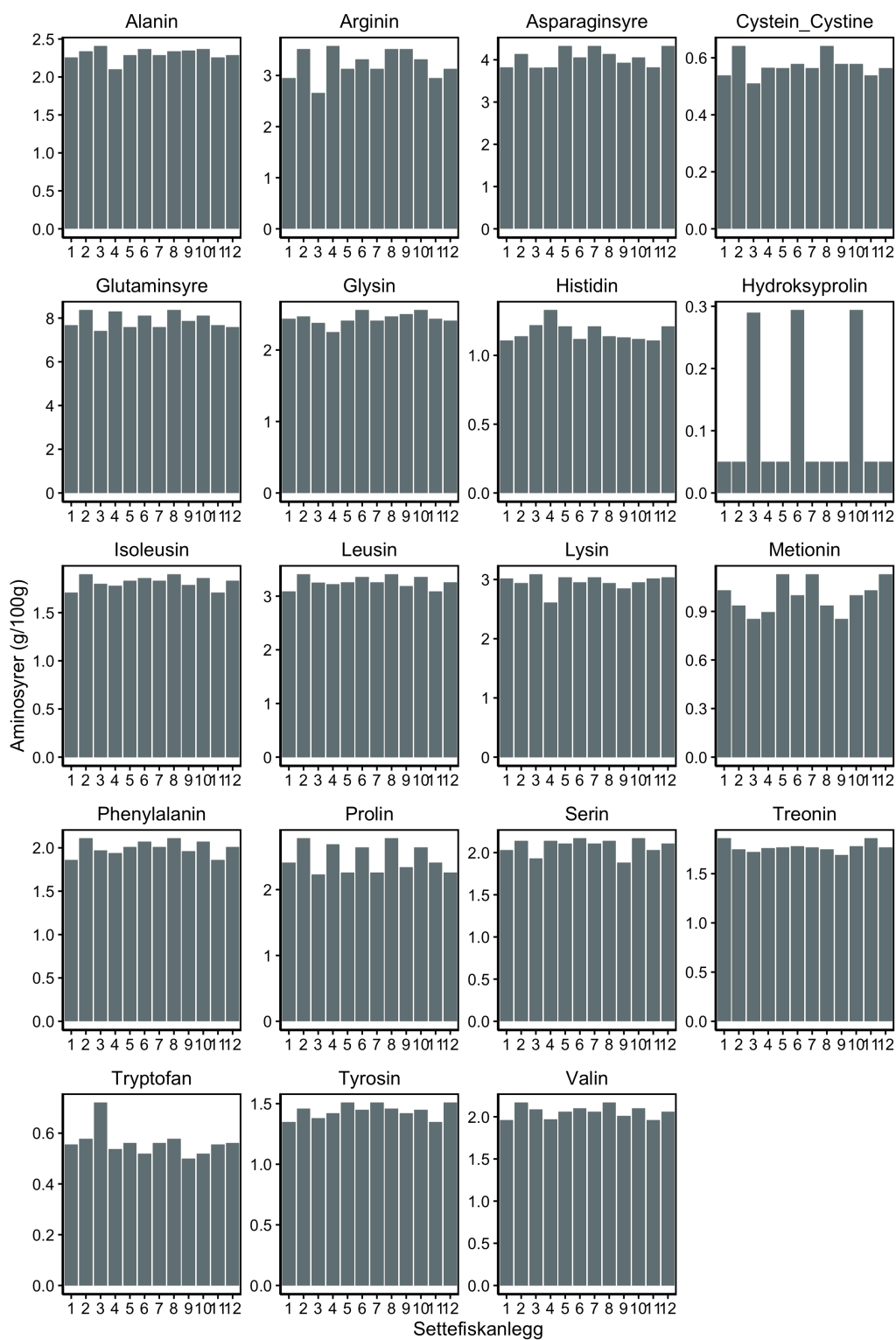
Figur V4: Konsentrasjoner av metaller (aluminium, kobber og jern) i vann i de ulike settefiskanleggene (mg/L).



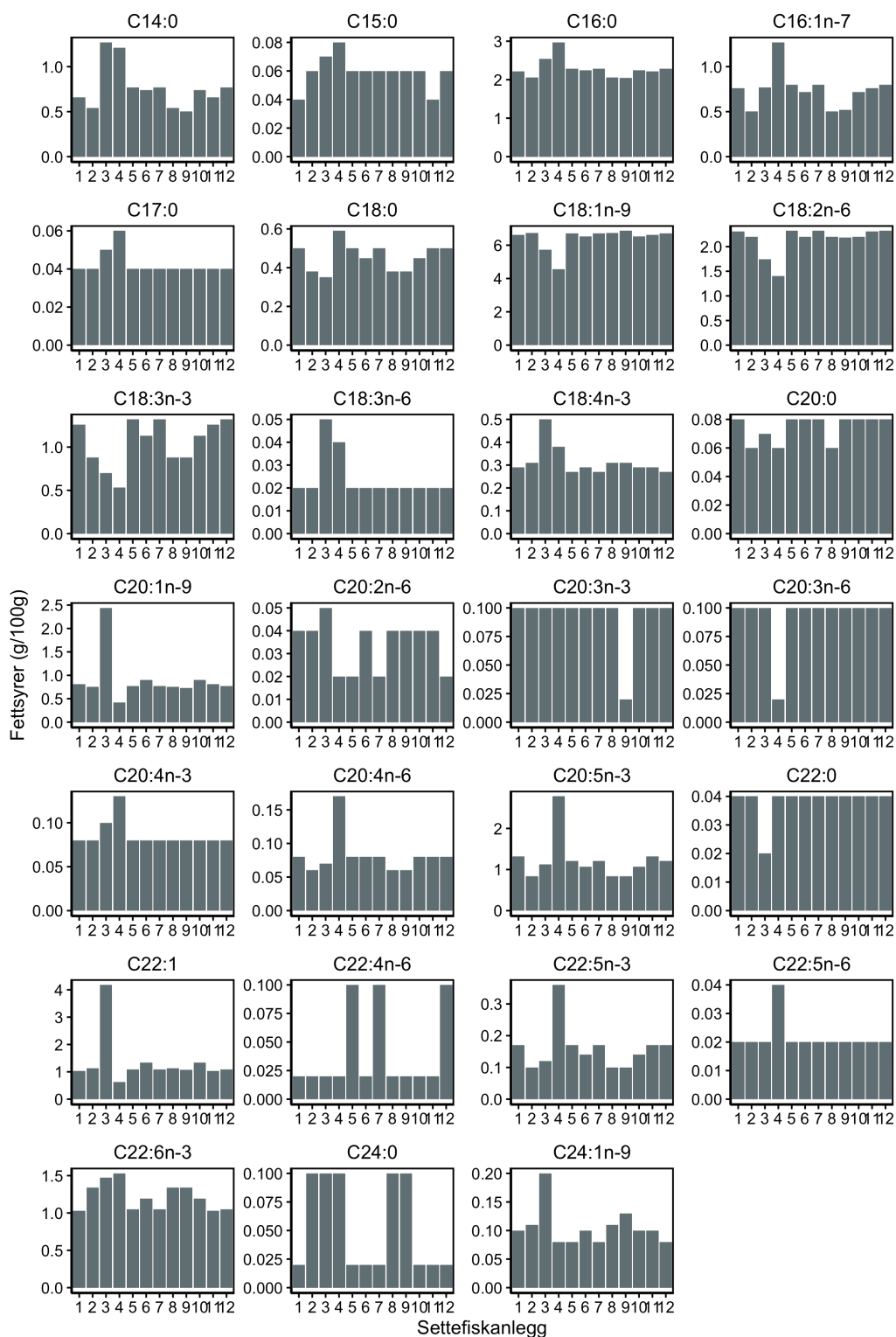
Figur V5: Konsentrasjoner av ulike ioner (mg/kg) i fôret brukt i settefiskanlegg (anlegg 1 til 12).



Figur V6: Innhold av ulike parametere i fôret brukt i settefiskanlegg (anlegg 1 til 12). Tørrstoff, protein og vanninnhold (g/100g), fett (%) og vitamin D3 (IU/L)



Figur V7: Innhold av aminosyrer (g/100g) i fôret brukt i settefiskanlegg (anlegg 1 til 12).



Figur V8: Innhold av fettsyrer (g/100g) i fôret brukt i settefiskanlegg (anlegg 1 til 12).