

NEFROSMOLT

Nefrokalsinose hos laksesmolt – en kartleggingsundersøkelse med fokus på risikofaktorer



Delrapport - FHF-901587

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

¹ Aqua Kompetanse AS

² Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU)

Forslag til sitering: Boissonnot L., Klykken C. & Stensby-Skjærvik S. (2021) Delrapport for NEF-ROSMOLT: Nefrokalsinose hos laksesmolt - en kartleggingsundersøkelse med fokus på risikofaktorer. FHF-901587, 34 pp.





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

Tittel: Delrapport for NEFROSMOLT: Nefrokalsinose hos laksesmolt – en kartleggingsundersøkelse med fokus på risikofaktorer (FHF-901587)

Forfattere: Lauris Boissonnot, Christine Klykken, Silje Stensby-Skjærvik

Kontaktperson Aqua Kompetanse AS: Christine Klykken (christine@aqua-kompetanse.no)

Prosjektleder Aqua Kompetanse AS: Lauris Boissonnot (lauris@aqua-kompetanse.no)

Dato: 10.03.2021

Prosjektvarighet: 01.09.2019 - 31.03.2022

Sammendrag: Nefrokalsinose har vært en kjent produksjonsrelatert sykdom hos laks i mer en 20 år. Tilstanden er beskrevet som utfelling av kalsium- og magnesiumsalter i nyrene som nedsetter nyrefunksjon. Dette svekker laksen og gjør den mer utsatt for sykdom og stress. Under *NEFROSMOLT*-prosjektet ble det gjennomført en systematisk kartlegging av tilstanden i settefiskanlegg i Midt-Norge. Resultatene indikerte at nefrokalsinose er svært vanlig hos laksesmolt både i gjennomstrømnings- og RAS-anlegg. I noen av anleggene hadde fisken alvorlige grader av nefrokalsinose som førte til store skader i nyrene. Dette medførte forøket dødelighet etter utsett i sjø. Resultatene indikerte ingen tydelig sammenheng mellom HSS og nefrokalsinose. Videre ble det observert at fisk med alvorlige grader av nefrokalsinose var > 200g. Det kan derfor se ut til at stor smolt har høyere risiko for å utvikle alvorlig nefrokalsinose. Gener involvert i metabolisme og energiomsetning var nedregulert i fisk med nefrokalsinose, mens gener involvert i celle-celle kommunikasjon og cellereparasjon var kraftig oppregulert. Dette kan bety at ved store endringer i nyrene så vil den primære oppgaven være reparasjon av vev. *NEFROSMOLT*-prosjektet undersøkte videre i hvilken grad miljøbetingelser påvirket utvikling av nefrokalsinose. Resultatene indikerte at tilstanden er mer knyttet til vannmiljøet enn fôrsammensetning. Særlig tilsetting av sjøvann i settefiskfasen viste seg å føre til både en økt andel fisk med nefrokalsinose og mer alvorlige nyreskader hos fisken. Dette er trolig knyttet til osmoreguleringsstress som påvirker ionbalanse hos fisken og derfor fører til ansamling av mineralkomplekser i nyrene, stort sett som amorf karbonatapatitt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$).

Innhold

1	Introduksjon	3
1.1	Bakgrunn	3
1.2	Målsetting	4
1.2.1	Hovedmål	4
1.2.2	Delmål	4
2	Materiale og metoder	5
2.1	Biologi	5
2.1.1	Vurdering av nefrokalsinose	5
2.1.2	Vurdering av HSS	6
2.1.3	Analyse av mineralsammensetning	6
2.1.4	RNA-sekvensering	7
2.1.5	Patogen-screening	7
2.2	Miljøbetingelser	8
2.2.1	Vannkvalitet	8
2.2.2	Fôrsammensetning	8
2.3	Statistiske analyser	9
3	Resultater og diskusjon	10
3.1	Vurdering av nefrokalsinose	10
3.2	Utbredelse av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i Midt-Norge	10
3.2.1	Utbredelse av nefrokalsinose i settefiskfasen	10
3.2.2	Utbredelse av nefrokalsinose etter utsett i sjø	12
3.3	Morfologiske og fysiologiske endringer	14
3.3.1	Nyreforandringer	14
3.3.2	Mineralsammensetning	14
3.4	Sykdomsstatus	15
3.5	Generegulering	16
3.6	Sammenheng mellom nefrokalsinose og HSS	16
3.7	Miljøfaktorer knyttet til utvikling av nefrokalsinose i settefiskfasen	16
3.7.1	Effekt av vannkvalitet på utvikling av nefrokalsinose	17
3.7.2	Effekt av fôrsammensetning på utvikling av nefrokalsinose	20
4	Foreløpige konklusjoner og veien videre	22
5	Referanser	23
6	Vedlegg	26

1 Introduksjon

1.1 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 fiskehelse-rapport 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 smolt syndrom (HSS) (Hjeltnes et al., 2019), og det har derfor blitt stilt spørsmålstegn ved 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 gitt 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 flow (Damsgård et al., 2011). Det er også mulig at høye nivåer av fosfat spiller en rolle (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 syrer 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). I fisk, særlig i en aktiv vekstfase, er det behov for disse komponentene, som tilsettes i betydelige mengder i fôr. Variasjoner av innhold i fôr mellom forskjellige produsenter og batcher har ikke vært dokumentert hos laks i settefiskanlegg. 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).

1.2 Målsetting

1.2.1 Hovedmål

Siden kunnskapsgrunnlaget på nefrokalsinose, og en eventuell kobling til HSS hos laks, er såpass mangelfullt og tilstanden ser ut til å være utbredt er det viktig å gå bredt ut i en undersøkelse av temaet. *NEFROSMOLT*-prosjektet har derfor prioritert å kartlegge utbredelsen og alvorligheten av nefrokalsinose i ulike anlegg i Midt-Norge. I tillegg er målet å identifisere sannsynlige årsaker til tilstanden, særlig knyttet til vannkvalitet og fôrsammensetning. Prosjektet også forsøker å svare på om nefrokalsinose øker risikoen for å utvikle HSS. Det er videre et mål å utvikle enkle tiltak som kan implementeres i settefiskanlegg for å senke forekomsten av nefrokalsinose.

1.2.2 Delmål

Prosjektet har tre delmål:

Delmål 1: Kartlegge forekomsten og alvorlighetsgraden av nefrokalsinose og HSS i 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 Materiale og metoder

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 smoltifiseringsgraden av fiskegruppene var høyest mulig på prøvetakingstidspunkt. Det ble undersøkt 360 friske fisk fra de samme gruppene 1 måned etter utsett i sjø. Rett etter hvert uttak ble laksen avlivet med overdose bedøvelsesmiddel.

2.1.1 Vurdering av nefrokalsinose

Nefrokalsinose ble vurdert visuelt og gitt en grad fra 0 til 4, der 0 indikerer ingen synlige utfellinger, mens ved grad 1 (mild) er samlerørene synlige (Fig. 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.



(a) Grad 1.



(b) Grad 2.



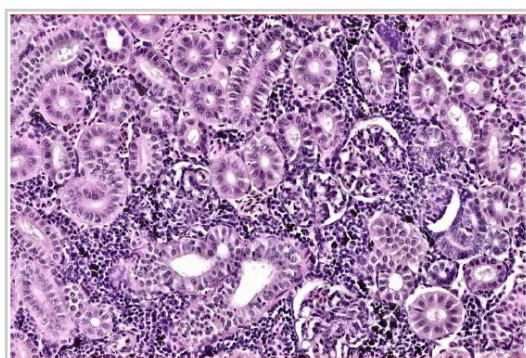
(c) Grad 3.



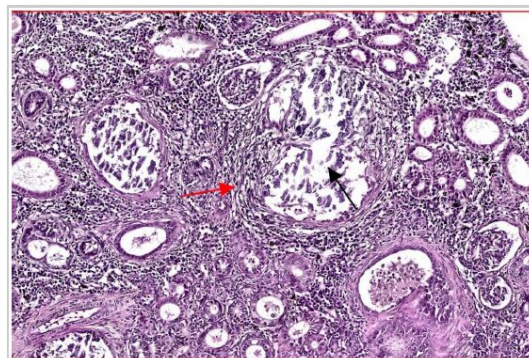
(d) Grad 4.

Figur 1: Visuelt vurdering av ulike grader av nefrokalsinose.

For å bekrefte visuelle funn ble prøver av midt-nyre fra alle individer analysert av Pharmaq Analytiq AS etter standard histologiske metoder (Fig. 2). Diagnosen nefrokalsinose ble stilt 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).

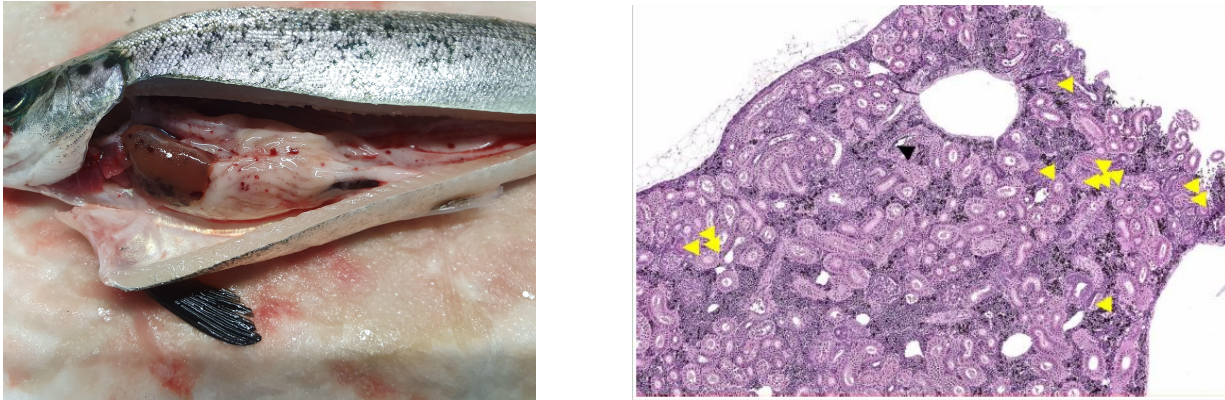
Figur 2: Histologisk vurdering av fisk uten og med nefrokalsinose.

2.1.2 Vurdering av HSS

HSS ble diagnostisert visuelt, og bekreftet med histologi. Den visuelle diagnosen ble stilt på bakgrunn av punktblødninger i muskulatur og/eller indre organ (Fig. 3a), mens på histologi ble blødninger i tubuli og utførselsganger benyttet som en verifisering av sykdommen (Fig. 3b).

2.1.3 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 prøver resultater.



(a) Punktblødninger i organ.

(b) Nyre med HSS (blødninger vist med gule piler).

Figur 3: Vurdering av HSS visuelt og histologisk.

2.1.4 RNA-sekvensering

Totalt 16 nyreprøver ble tatt ut fra fisk med alvorlige grader av nefrokalsinose ($n = 8$) og hos fisk uten nefrokalsinose ($n = 8$) for molekylærobiologiske analyser. De ble holdt frosset (-20 °C) frem til analyse. Forskjeller i genregulering hos individer med og uten nefrokalsinose ble undersøkt med RNA-sekvensering som ble utført ved Genomic core enheten hos NTNU. RNA-sekvensering ble utført etter standard metoder med RNA ekstraksjon, mRNA berikelse eller ribosomal RNA utarming, cDNA syntese og preparasjon av adaptor-ligert sekvenserings bibliotek. Biblioteket ble så sekvensert ned til en dybde på 10–30 millioner «reads» per prøve på en «high-throughput» plattform. Det siste steget som ble utført innebar bioinformatikken, med justering og/eller montering av sekvenserings-«reads» til et transkriptom, kvantifisering av «reads» som overlappet transkripsjoner, filtrering og normalisering mellom prøver, og statistisk modellering av signifikante endringer i genuttrykk til individuelle gener og/eller transkripsjoner mellom prøvegrupper (Stark et al, 2019). Bioinformatikken ble behandlet ved Strombus Genomics i Maroochydore i Australia (samarbeidspartner med NTNU).

2.1.5 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 infeksiøs pankreas nekrose virus (IPN).

2.2 Miljøbetingelser

2.2.1 Vannkvalitet

På hvert besøk hos settefiskanlegg ble det tatt vannprøver i triplikater, fra det samme karet der 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. 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 1: Deteksjonsgrenser (mg L⁻¹) til ulike parametere målet i vannet ved kartleggingen i settefiskanlegg.

2.2.2 Fôrsammensetning

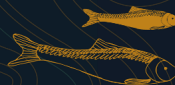
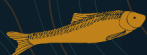
Fôrprøver ble samlet på hvert settefiskanlegg og frosset (-20°C) inntil videre analyser. Analysene ble gjennomført av Sintef Norlab AS og Eurofins Food & Feed Testing Norway AS. Konsentrasjoner av kalsium, fosfat, natrium, klorid, jern og magnesium ble analysert ved induktivt koblet plasma massespektrometri (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.

2.3 Statistiske analyser

Hovedandelen av statistiske analyser ble utført med R open source-programvare (R Core Team, 2019). Signifikansnivå var satt til $p < 0,05$. Normaldistribusjon av data ble testet med Shapiro-Wilk's test. Ved normaldistribusjon 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 normaldistribuert, 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.

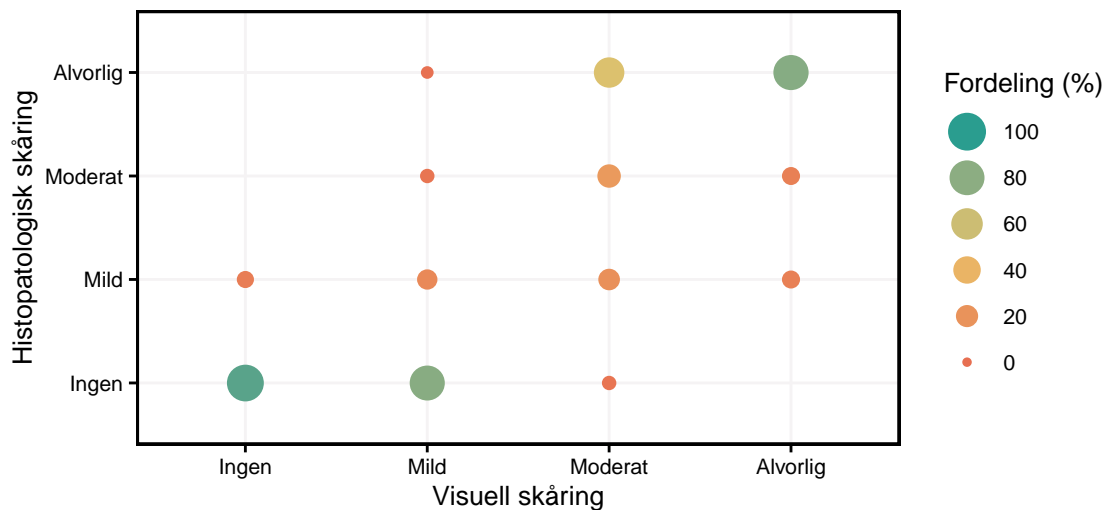
Det ble utført en Multiblock PLS (partial least squares) analyse på alle miljødataene fra kartleggingen relatert til andel nefrokalsinose i hvert anlegg. I PLS-regresjon forsøker man å finne sammenhenger mellom forklaringsvariabler og en responsvariabel, ved at man antar at de er generert av en felles 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).



3 Resultater og diskusjon

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. 4). 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.



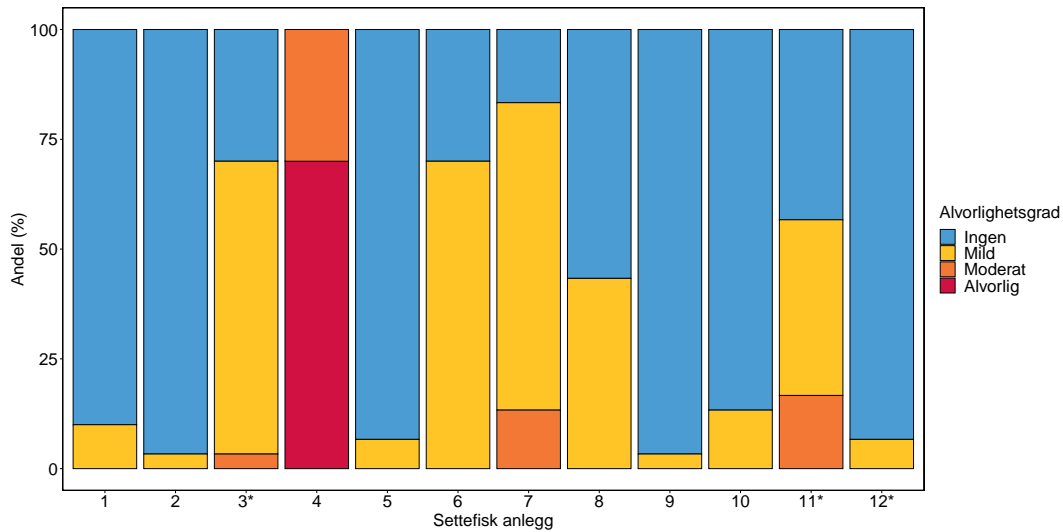
Figur 4: Visuell skåring av nefrokalsinose sammenliknet med histopatologisk vurdering. Størrelse på sirkel angir prosent vurdering som er likt ved visuell og histopatologisk vurdering.

3.2 Utbredelse av nefrokalsinose hos oppdrettslaks i Midt-Norge

3.2.1 Utbredelse av nefrokalsinose i settefiskfasen

Det ble påvist nefrokalsinose i alle anlegg som ble undersøkt, men det var store variasjoner mellom anleggene (Fig. 5). 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 hadde fisk med milde forandringer i nyrene.

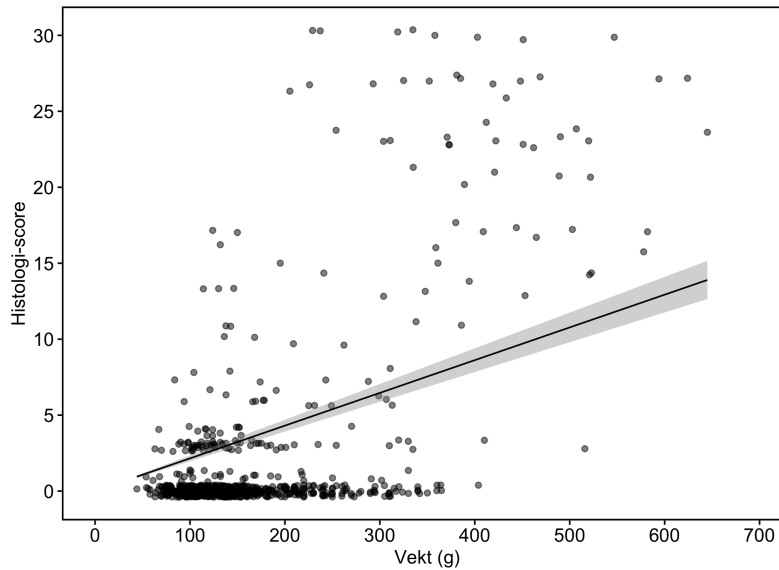
Gjennomsnittlig viste dette at nesten 40% av laksesmolt i undersøkelsen fikk påvist nefrokalsinose mot slutten av produksjonssyklusen i settefiskanlegget.



Figur 5: Andel fisk (%) uten og med nefrokalsinose fordelt på alvorlighetsgrad i ulike settefisk anlegg. 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. 5). Det ble påvist nefrokalsinose hos 44% av laksesmolt i RAS-anleggene, med hovedsakelig milde former. I gjennomstrømningsanleggene ble det funnet lavere andel fisk med nefrokalsinose (33%) men til gjengjeld mer alvorlige grader.

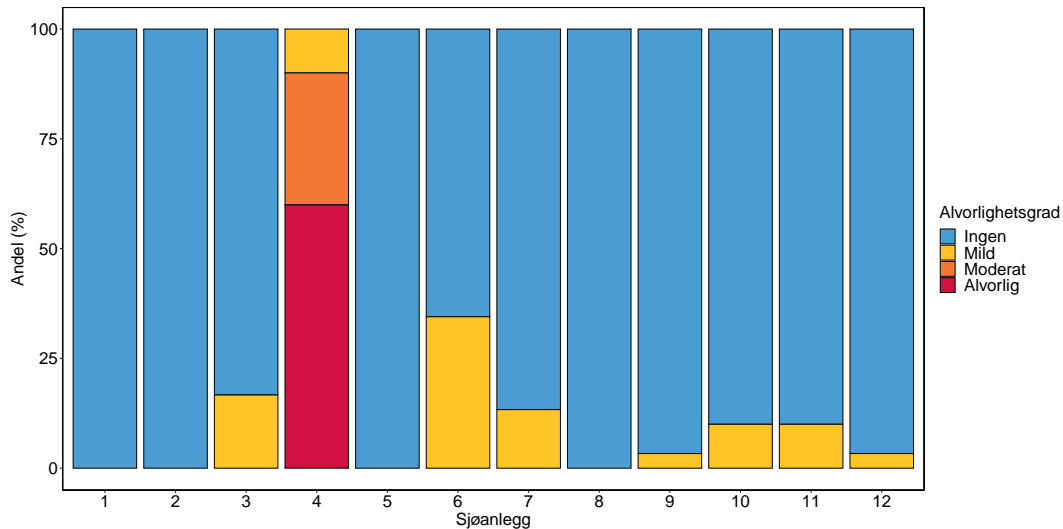
Resultatene fra studien tyder på at større fisk (> 200 g) var mer utsatt for nefrokalsinose (Fig. 6). 90% av fisk som veide over 400 g hadde moderate eller alvorlige grader av nefrokalsinose. Det kan derfor se ut til at stor smolt har høyere risiko for å utvikle alvorlig nefrokalsinose.



Figur 6: Nefrokalsinose-score vurdert histopatologisk mot fiskens vekt (g). Hvert punkt representerer 1 individ. Linjen angir linear regresjon med standard avvik ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,43$).

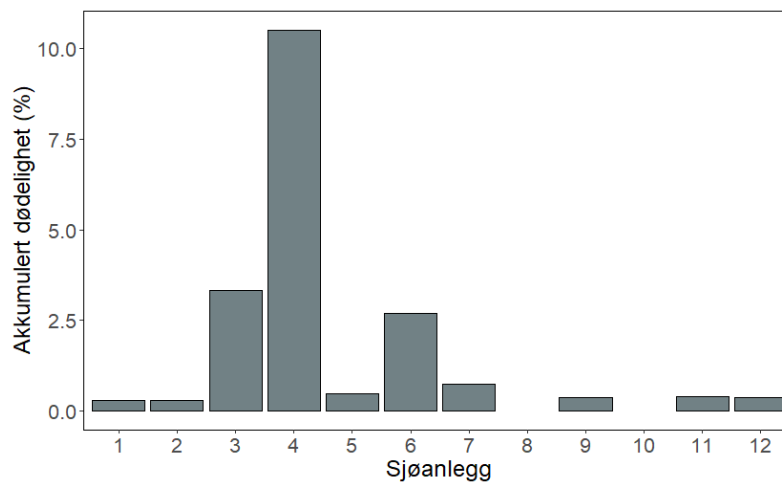
3.2.2 Utbredelse av nefrokalsinose etter utsett i sjø

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 sunket etter utsett i sjø (23% mot 36% i settefiskanlegget, Fig. 7). 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 nedgang i fisk med milde og moderate grader av nefrokalsinose (10% mot 30% i settefiskfasen). Derimot ble det funnet like stor andel av 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.



Figur 7: Andel fisk (%) uten og med nefrokalsinose fordelt på alvorlighetsgrad i ulike mottaksanlegg (sjønlegg). Anlegg 4 skilte seg tydelig fra de andre anlegge med høyere alvorlighetsgrad av nefrokalsinose ($p < 0,001$, se Tab. V2).

Det ble funnet forøket dødelighet etter 1 mnd i sjø ($>1,5\%$ ihht mattilsynets retningslinjer) i 3 anlegg i undersøkelsen (Fig. 8). Av disse 3 anleggene oppga fiskehelse rapportene nefrokalsinose som dødelighetsårsak kun ved 1 anlegg (anlegg 4). Dette var anlegget som mottok fisk med mest 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.

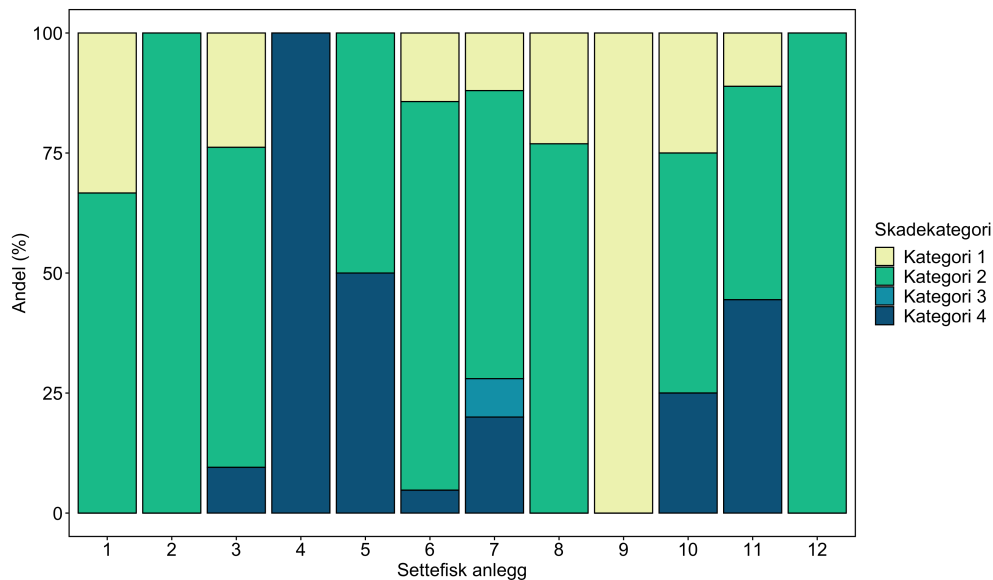


Figur 8: Akkumulert dødelighet (%) etter 1 måned i sjø for de 12 mottaksanleggene.

3.3 Morfologiske og fysiologiske endringer

3.3.1 Nyreforandringer

Alle individer diagnostiserte med nefrokalsinose hadde utfellinger av mineraler i nyrene. De fleste (87%) hadde også skader på vev i nyrene, mens omlag 30% også hadde forandringer som påvirker nyrenes evne til filtrering. 34% hadde i tillegg forandringer i det bloddannende vevet i nyrene. I de fleste settefiskanleggene hadde utfellingene ført til skader i tubuli og samlerør (kategori 2) hos den største andelen av fisken (Fig. 9). Anlegg 9 skilte seg ut der fisken med nefrokalsinose kun hadde utfellinger i nyrene. 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.



Figur 9: 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: Utfellinger 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).

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.

3.3.2 Mineralsammensetning

Amorf karbonatapatitt (amCAP) ble funnet i 98,6% av mineralkompleksene (Tab. 2). De fleste mineralkompleksene inneholdt kun amCAP (60,9%), men enkelte mineralkomplekser inneholdt både amCAP og et annet mineralkompleks (newberyitt: 8,7%, whitlockitt: 7,2%, brushitt: 7,2%, struvitt: 4,3%), mens andre inneholdt 2 mineralkomplekser i tillegg til amCAP (brushitt og whitlockitt: 2,9%, struvitt og whitlockitt: 2,9%, struvitt og newberyitt: 1,4%).

Tabell 2: 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. I mennesker ser man sjelden steiner med >30% amCAP, og da har pasientene i tillegg nesten uten unntak struvitt, som indikerer bakterieinfeksjon (pers. komm. Prof. M.K. Moe). Denne type nyresteinskompleks er også uvanlig hos hund og katt (Osborne, 2009), og kobles da til tilstander som hyperkalsemi, hyperparatyroidisme, hypervitaminose D og dystrofisk og ektopisk mineralisering av vitale vev (Osborne, 1995). De fleste nyresteiner hos hund og katt blir funnet i blæra eller urethra. Kun omlag 5% sitter i nyrene eller ureteres. De hyppigst forekommende nyresteinene hos hund og katt er kalsiumoksalat og struvitt. En viktig predisponerende faktor for dannelsen av struvittkrystaller hos hund er bakterieinfeksjoner (Grauer, 2009). Vi antar at det er lite sannsynlig at etiologi og patogenese kan sammenlignes direkte mellom pattedyr og fisk.

3.4 Sykdomsstatus

Fiskehelsesrapportene hentet fra de ulike settefiskanleggene i kartleggingsperioden viste at fisken var frisk uten påvist sykdom. Nefrokalsinose var diagnostisert hos enkelte av anleggene.

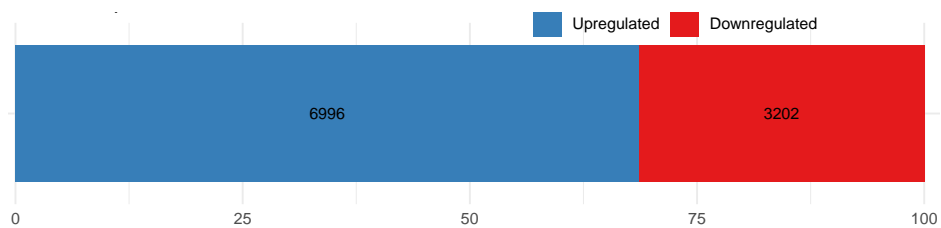
Hos pattedyr kan nyreforkalkninger skyldes bakterielle infeksjoner. For å undersøke om dette kan være tilfelle hos fisk ble nyreprøver fra 13 fisk med ulike typer mineralkomplekser analysert med qPCR for de mest vanlige patogenene funnet hos laks (*Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *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 positiv resultat i 7 av de 13 undersøkte fiskene ($C_t = 32,9 \pm 1,1$). Dette var lave virusmengder, 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 som ble undersøkt i denne studien hadde vært vaksinert flere måneder før uttaket og det var derfor lite sannsynlig at IPN som ble påvist var knyttet til vaksinerings.

3.5 Generegulering

RNA sekvenseringen viste klare forskjeller mellom kontrollgruppen (frisk fisk) og fisken med alvorlige grader av nefrokalsinose. Det ble funnet 6996 oppregulerte og 3202 nedregulerte gener hos fisk med nefrokalsinose (Fig. 10). Generelt viste analysen at en rekke gener involvert i metabolisme og energiomsetning var nedregulert hos fisken med nefrokalsinose, mens gener involvert i celle-celle kommunikasjon og cellereparasjon var kraftig oppregulert. Dette kan forklares med at alvorlige grader av nefrokalsinose innebærer store vevsskader og forstyrrelser av funksjon, som forsøkes reparert ved oppregulering av cellereparasjon og kommunikasjon. En generell nedregulering av energimetabolisme kan forklares med organskadene eller som en respons på redusert tilgang på næring- og oksygentilgang i mikromiljøet.

Analysen ga først og fremst en indikasjon på hva som skjer når det er omfattende skader på nyrene hos laks, og ikke nødvendigvis hvilke mekanismer som gir nefrokalsinose.



Figur 10: Antall gener opp- og nedregulert hos fisk med nefrokalsinose sammenlignet fisk uten nefrokalsinose ($n_{tot} = 16$).

3.6 Sammenheng mellom nefrokalsinose og HSS

Det har tidligere blitt foreslått at HSS og nefrokalsinose kan være knyttet sammen, 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.

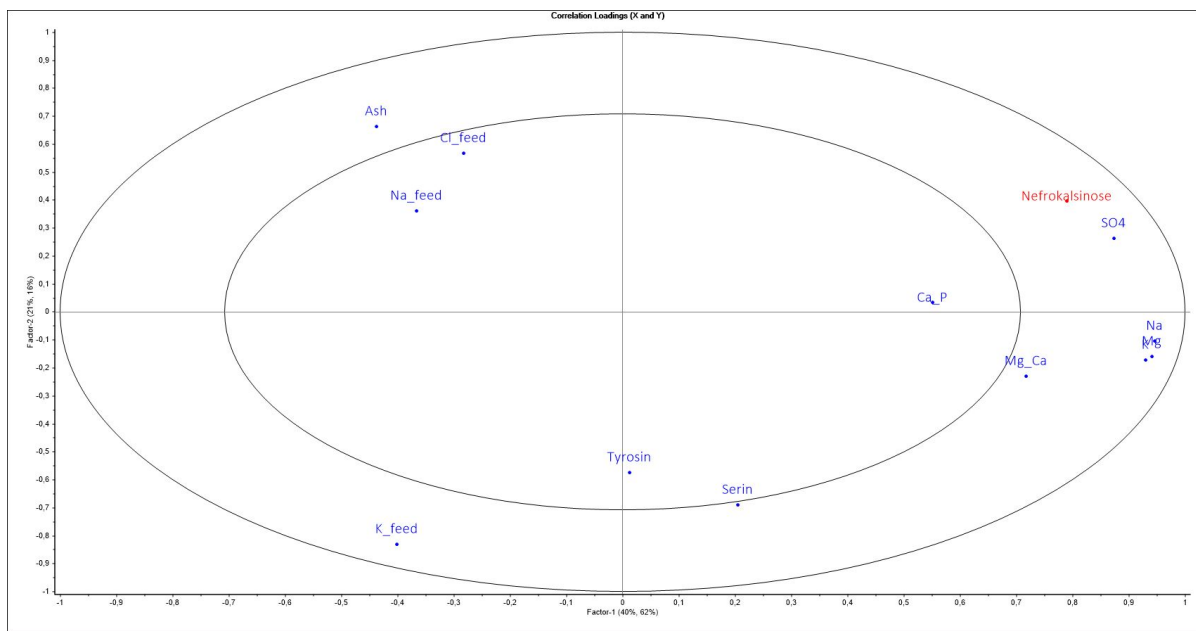
3.7 Miljøfaktorer knyttet til utvikling av nefrokalsinose i settefiskfasen

Det er en bred enighet i at nefrokalsinose er en miljøbetinget lidelse, som skyldes suboptimale forhold i produksjonsmiljøet. Med bakgrunn i dette ble det valgt å prøveta både karvann og fôr, og undersøke begge for et stort antall parametere. Disse dataene ble så lagt inn i en datamatrix som ble behandlet statistisk med en multiblock PLS analyse, for å se hvilke parametere i denne undersøkelsen 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.11). Konsentrasjonen av sulfat kan forklares med tilsetning av sjøvann (se kapittel 3.7.1).

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 ($p > 0,005$, $R^2 < 0,3$).

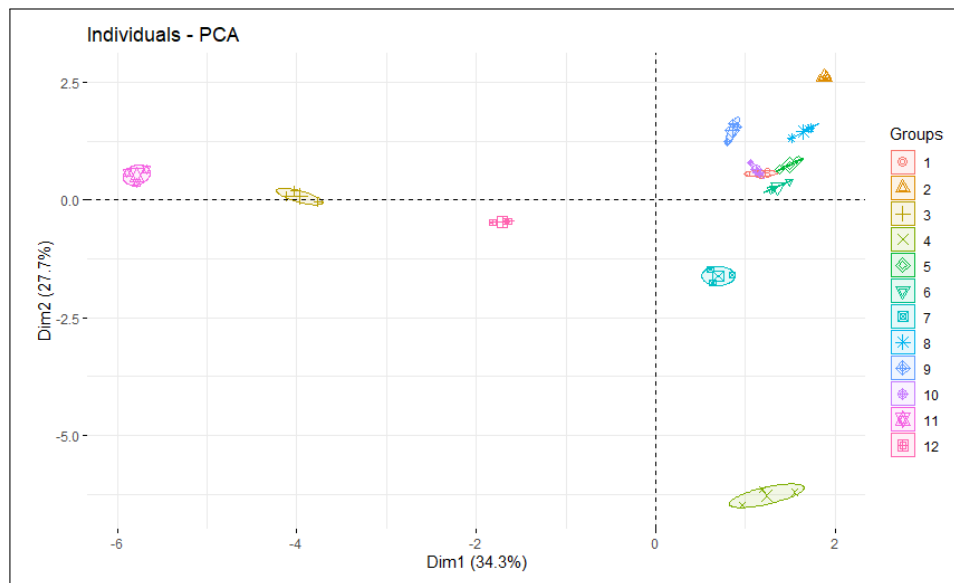


Figur 11: Correlation-loading plot som viser forholdet mellom miljøvariablene og responsvariabelen (nefrokalsinose). Modellen var utledet fra 85 variabler, og med dimensjonsreduksjon ga 12 variabler best modell og validering for datasettet. Variabler for førsammensetning var aske (Ash), klorid (Cl_feed), 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.

3.7.1 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. 12). 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. 3) og dette førte til forskjeller i ioner som er typiske i sjøvann (Cl, Na, SO₄, Mg, Ca, K, Fig. V3).

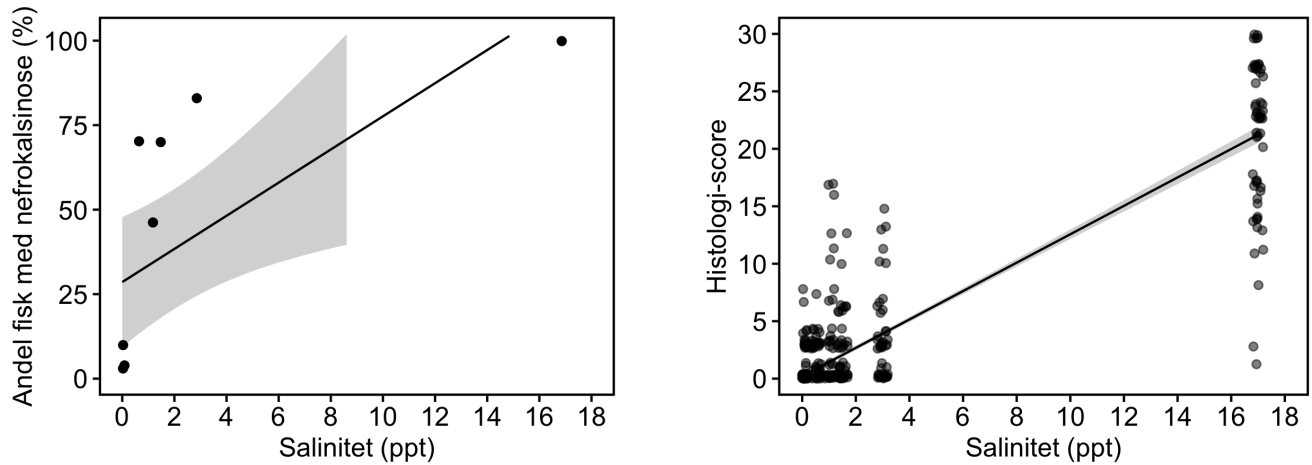


Figur 12: Principal component analyse (PCA) av vannkvaliteten i settefiskanleggene fra kartleggingsundersøkelsen (Groups angir anlegg 1-12).

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

Tabell 3: Salinitet i settefiskanleggene som tilsatt sjøvann eller salt. Tabellen viser kun verdier som ble målet under kartleggingen (mot sjø-utsett).

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. 13). I anlegg som ikke benyttet sjøvann ble det funnet generelt lite nefrokalsinose, og kun milde grader.



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

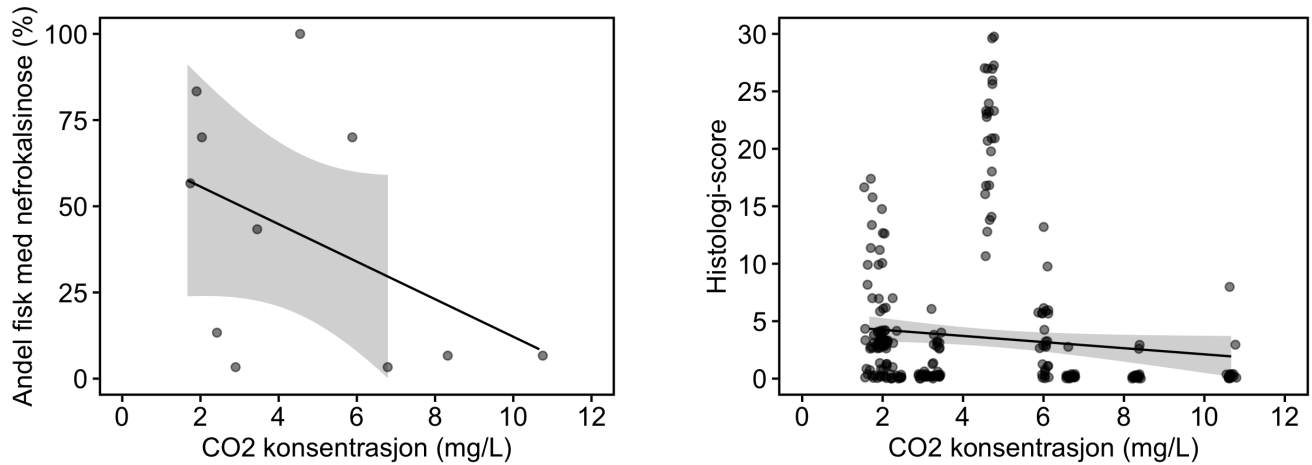
(b) Nefrokalsinose-score vurdert histopatologiske fordelt på salinitet i ulike settefiskanlegg. Hvert punkt representerer 1 fisk. Linjen viser linear regresjon med standard avvik ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,80$).

Figur 13: Nefrokalsinose fordelt på salinitet i ulike settefiskanlegg.

Anleggene som benyttet sjøvannstilsetning i produksjonen sin hadde ulike strategier når det gjaldt både oppstart, konsentrasjon, og om tilsetningen øktes 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 så til 12-15 ppt 2 uker før prøveuttak. 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). Salinitet på 8-12 ppt kan derfor forvirre fisken som ikke får et klart signal om den er i ferskvann eller sjøvann (Attramadal 2020). Dette kan føre til osmoreguleringsstress som påvirker ionbalanse i fisken og derfor trolig fører til ansamling av mineralkomplekser i nyrene. Xiong et al. (2020) studerte effekt av salinitet på vekst, overlevelse, osmoregulering og energibalanse hos regnbueørret og konkluderte at fisk som kun gikk i ferskvann hadde best prestasjon, vekst og velferd. Det er behov for å videre undersøke fysiologiske endringer i fisk som er utsatt for vann med suboptimal salinitet.

Det er en debatt i litteratur 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. 14).



(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 14: Nefrokalsinose fordelt på CO₂ konsentrasjoner i ulike settefiskanlegg.

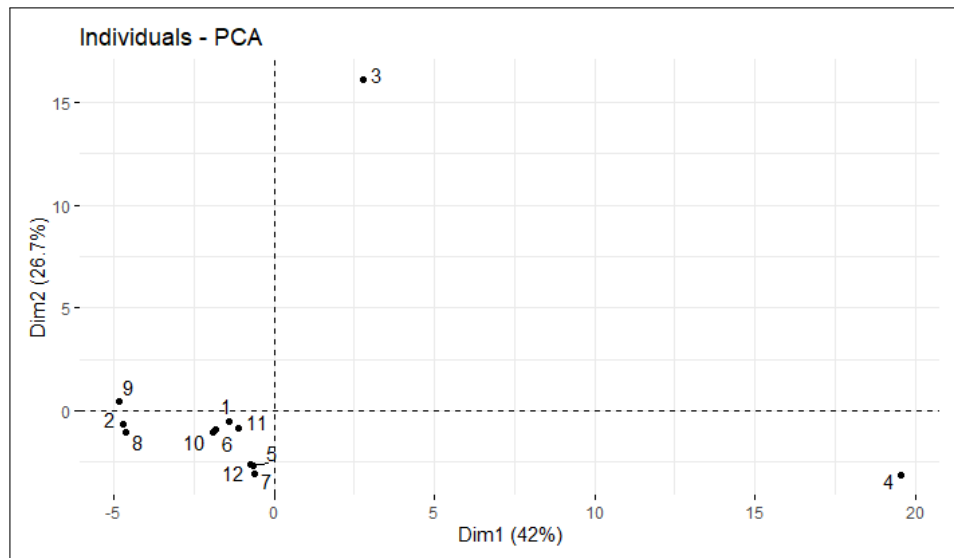
3.7.2 Effekt av fôrsammensetning på utvikling av nefrokalsinose

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). Videre var det forskjeller i flere parametere mellom anleggene (Tab. 4), men samlet sett var det fôrene i anlegg 3 og 4 som skilte seg mest fra de øvrige fôrene og også fra hverandre (Fig. 15). Videre undersøkelser fant få forskjeller i aminosyrer mellom de ulike fôrene, unntatt 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. 15). Av anleggene som hadde største andel fisk med nefrokalsinose var 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 fôr kvalitet kan forverre tilstanden i enkelte tilfeller, men prosjektet kan ikke konkludere med dette. Videre undersøkelser bør gjennomføres for å løse 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: 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 15: Principal component analyse (PCA) av fôrkomponenter i settefiskfôr fra kartleggingsundersøkelsen (Hvert punkt representerer fôr fra anlegg 1-12).

4 Foreløpige konklusjoner og veien videre

Alle settefiskanleggene som ble undersøkt i *NEFROSMOLT*-prosjektet hadde fisk med nefrokalsinose. Dette tyder på at tilstanden er svært vanlig hos laksesmolt i Midt-Norge, både i anlegg med RAS-teknologi og i gjennomstrømningsanlegg. I de fleste settefiskanleggene hadde fisken milde grader av nefrokalsinose (utfellinger i nyrene og mindre vevskader), men enkelte anlegg hadde fisk med alvorlig forandringer i nyrene. Fisken med svært alvorlige skader i nyrene hadde sannsynligvis utfordringer ved overgang til sjøfasen som resulterte i økt dødelighet. Derimot så det ut til at fisk med milde forandringer greide seg godt etter utsett i sjø.

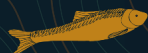
Resultatene fra studien tyder på at nefrokalsinose i all hovedsak er relatert til settefiskfasen og skyldes mest sannsynlig suboptimale miljøbetingelser. Vannkvalitet viste seg å være den mest betydelig faktor for nefrokalsinose selv om førsammensetning muligens spilte en sekundær rolle. I anleggene som tilsatte sjøvann i løpet av produksjonen fikk en større andel fisk påvist alvorlige grader av nefrokalsinose. Det er trolig at brakkvanns-saliniteter (8-12ppt) kan være forvirrende for parr/smolt. Dette kan føre til osmoreguleringsstress som påvirker ionbalanse hos fisken og derfor trolig fører til ansamling av mineralkomplekser i nyrene.

Betydningen av sjøvannstilsetning vil testes ut i 2021 under *NEFROSMOLT*-prosjektet både i karforsøk og i kommersielle anlegg for å kunne definere hvilken saliniteter som bør unngås i settefiskfasen for å forsøke å forhindre eller bremse utvikling av nefrokalsinose. I tillegg er det tatt blodprøver av alle fisk som ble undersøkt under kartleggingen og disse vil analyseres for å kunne knytte blodkjemi til miljøbetingelser og videre til utvikling av nefrokalsinose.

5 Referanser

- Attramadal K. (2020) Vannkvalitet med fokus på sjøvann og fiskehelse. Presentasjon under webinar for nefrokalsinose hos laksesmolt. Digitalt.
- 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.
- Bruno DW. (1996) Nephrocalcinosis. *Aquaculture Information Series*. Marine Laboratory, Aberdeen, 16, 1-5.
- 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.
- 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.
- Fikri A., Recai T., Hijran YY., Oguz K. (2000) Nephrocalcinosis in intensively reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 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 Postsmolt 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lewis 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.
- Mota VC., Nilsen TO., Gerwins J., Gallo M., Ytteborg E., Bæverfjord 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.
- 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., Hjeltnes B. (2006) Helsenhetssituasjonen hos oppdrettsfisk 2006. Veterinærinstituttet, 20pp.
- 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.



- 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.
- 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.
- Stark R., Grzelak M. Hadfield, J. (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nature Review Genetics* 20, 631–656.
- 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.
- Vezzoli G., Terranegra A., Arcidiacono T. Soldati L. (2011) Genetics and calcium nephrolithiasis. *Kidney International* 80: 587-593.
- 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.

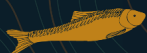
6 Vedlegg

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	.	.	***	***	.	***	***	**	.	.	***

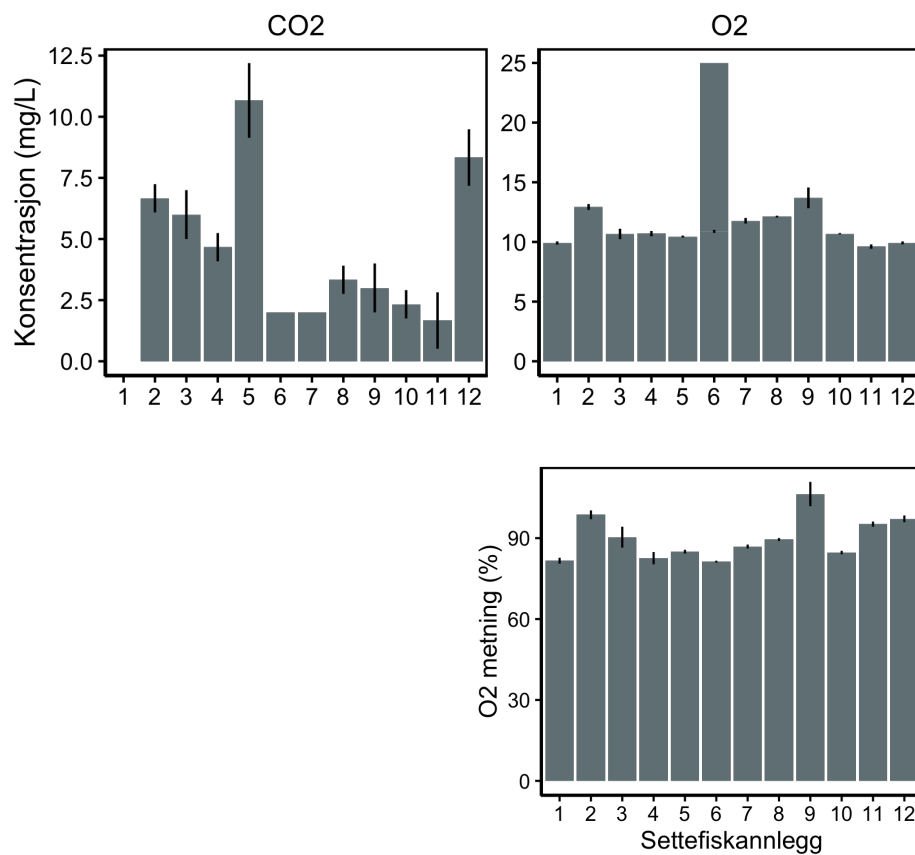
Tabell V2: Statistisk forskjell i alvorlighetsgrad av nefrokalsinose mellom fisk fra ulike matfiskanlegg (anleggene 1 til 12). $p < 0,001$: '***'; $p < 0,01$: '**'; $p < 0,05$: '*'; $p > 0,05$: '.'

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

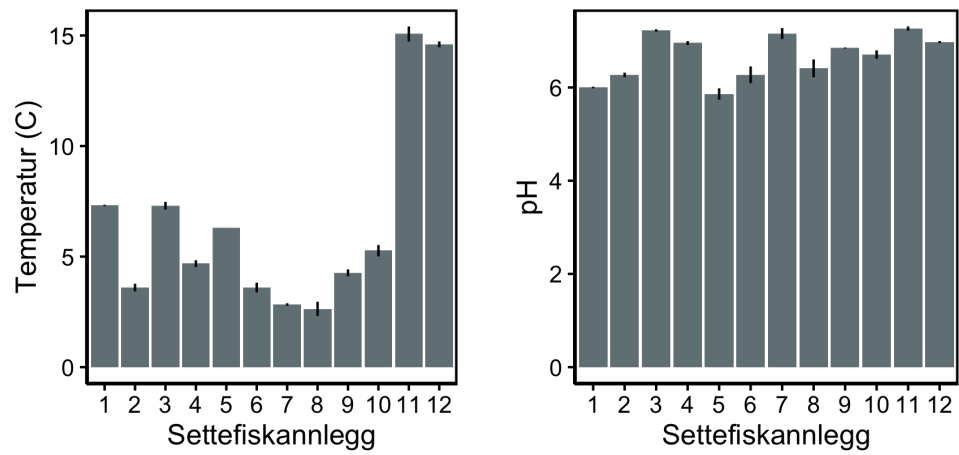


Tabell V3: Statistisk forskjell i skadekategorier mellom fisk med nefrokalsinose fra ulike settefiskanlegg (anleggene 1 til 12). $p < 0,001$: '***'; $p < 0,01$: '**'; $p < 0,05$: '*'; $p > 0,05$: '.'

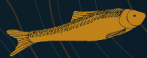
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	.										
3	***	***									
4	***	***	***								
5	.	.	***	***							
6	***	***	.	***	***						
7	***	***	.	***	***	.					
8	**	***	.	***	**	*	***				
9	.	.	***	***	.	***	***	***			
10	.	.	***	***	.	***	***	*	.		
11	***	***	.	***	***	.	.	.	***	***	
12	.	.	***	***	.	***	***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

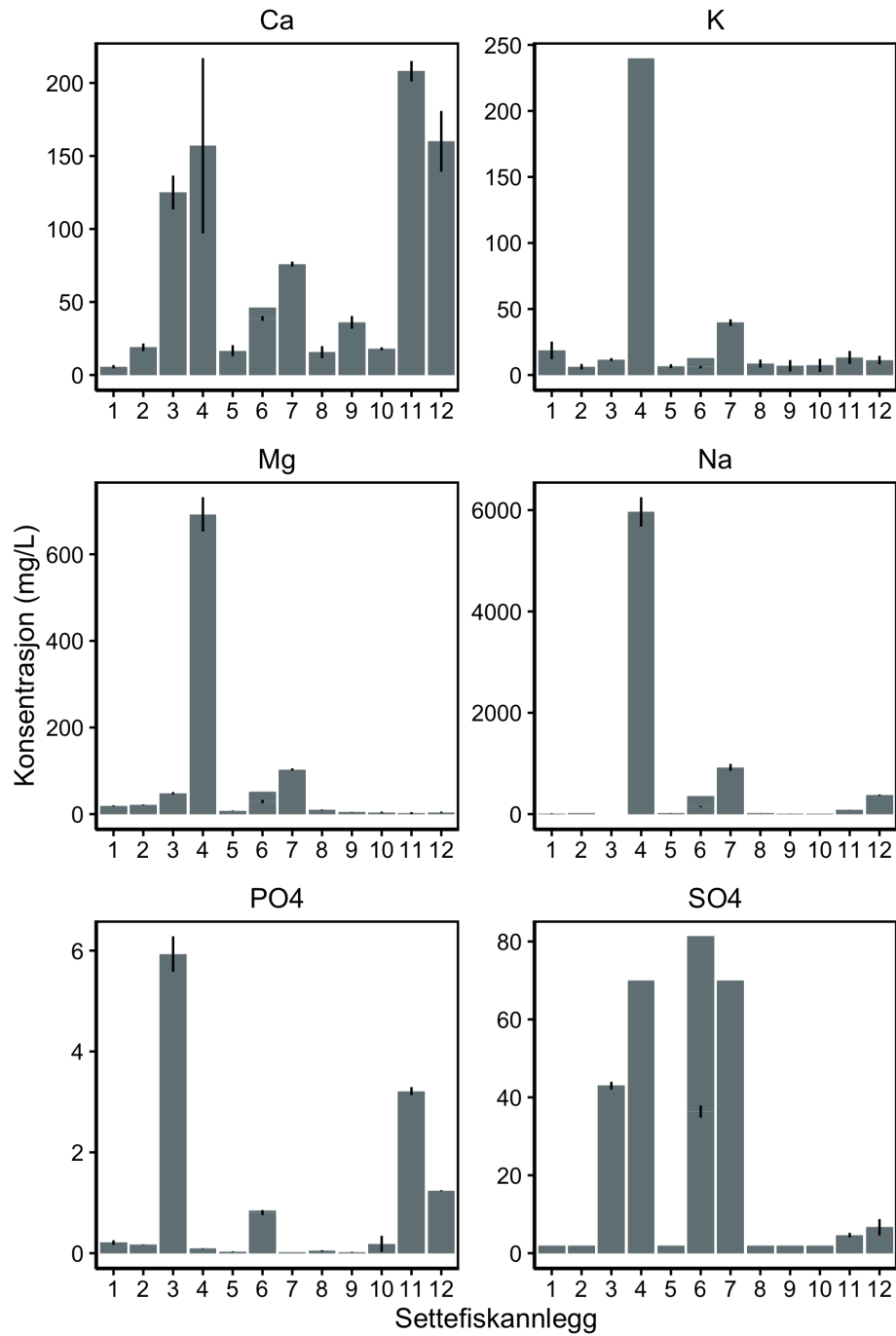


Figur V1: CO₂ og O₂ konsentrasjoner og O₂ metning i vann i de ulike settefiskanleggene.

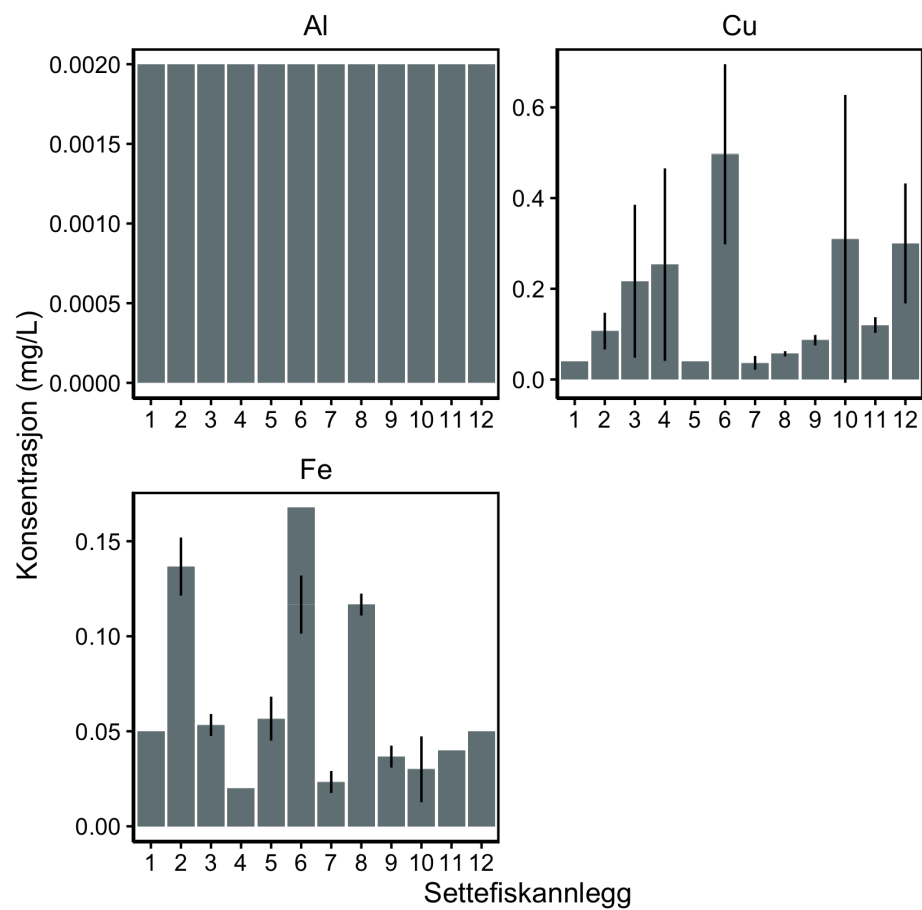


Figur V2: Temperatur og pH i vann i de ulike settefiskanleggene.

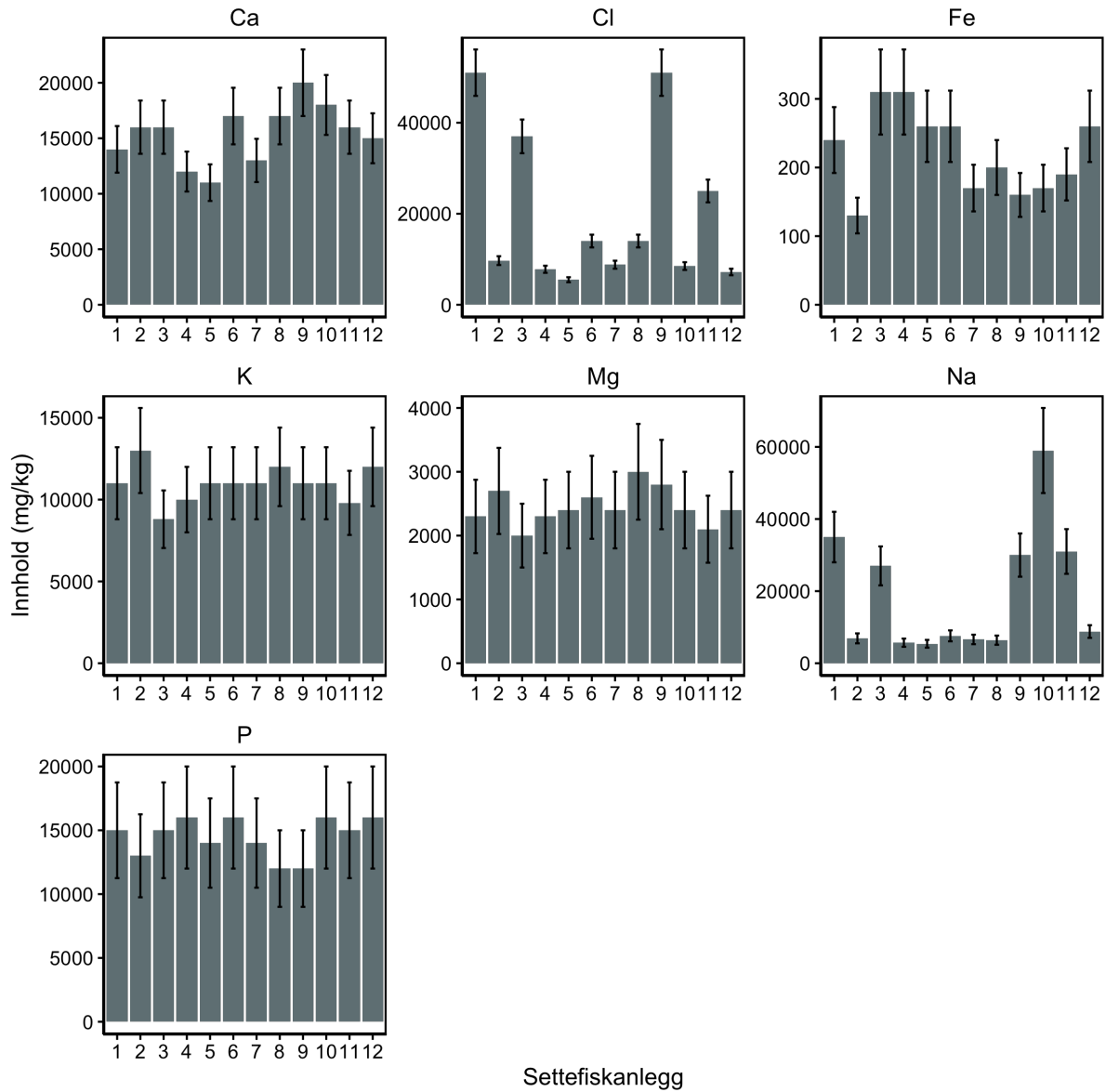




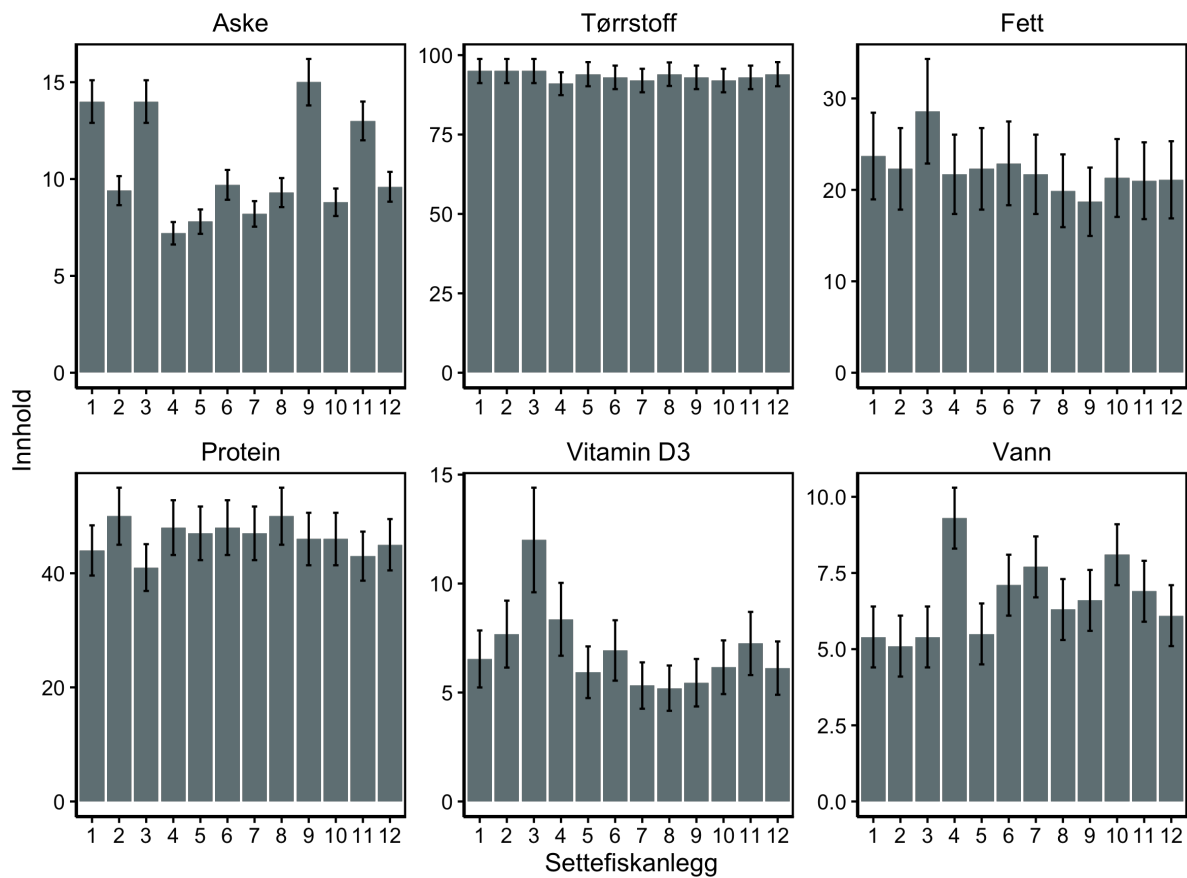
Figur V3: Konsentrasjoner av ioner (kalsium, kalium, magnesium, natrium, fosfat og sulfat) i vann i de ulike settefiskanleggene.



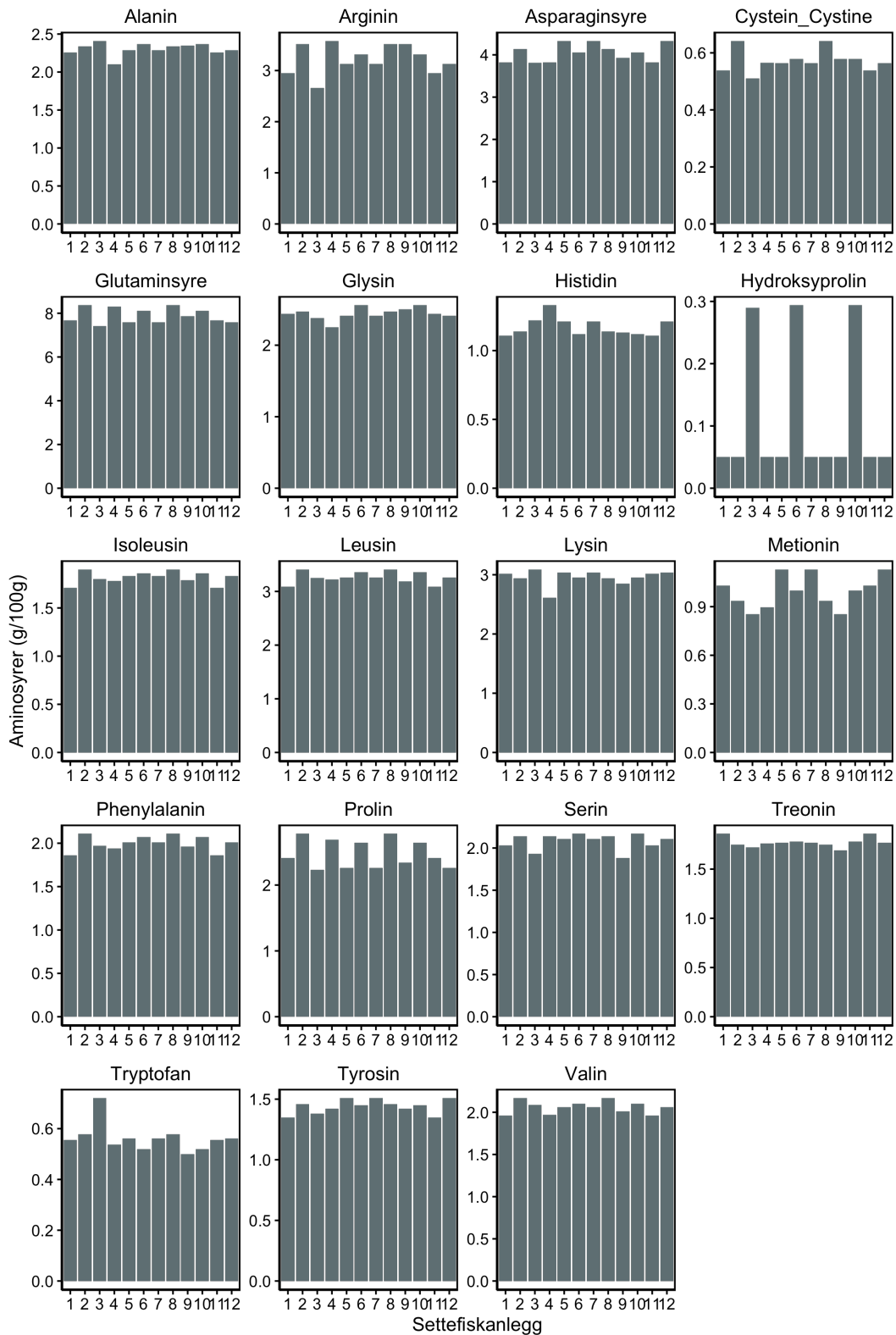
Figur V4: Konsentrasjoner av metaller (aluminium, kobber og jern) i vann i de ulike settefiskanleggene (mg/L).



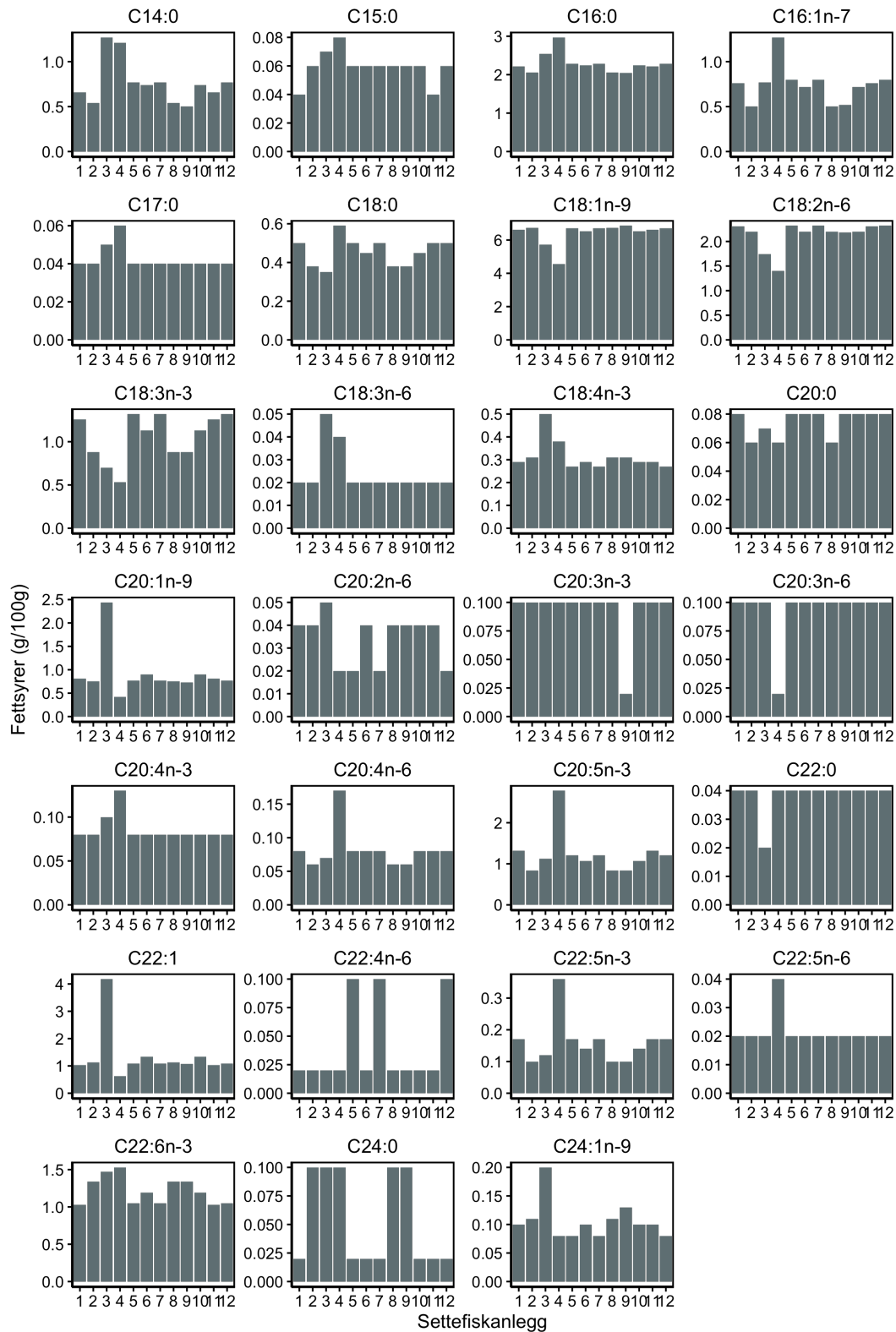
Figur V5: Konsentrasjoner av ulike ioner (mg/kg) i føret brukt i settefiskanlegg (anlegg 1 til 12).



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).