



Nyrestein hos laks

Nefrokalsinose er en av de største velferdsutfordringene i norske settefiskanlegg. Denne nyrelidelsen har vært kjent fra oppdrettsfisk i lang tid, men den medisinske og fysiologiske forståelsen av årsaken til skadene er mangelfull. Hvorfor har dette blitt et større problem og hva kan vi gjøre for å redusere forekomsten?

Av: Arve Nilsen², Sveinung Fivelstad¹, Camilla Diesen Hosfeld¹, Anne Berit Olsen², Kai-Inge Lie⁴, Marianne Kraugerud⁴, Per Gunnar Fjellidal³, Ingunn Sommerset², Ian Mayer⁵ og Sofie Charlotte Remø³

¹: Høgskulen på Vestlandet;

²: Veterinærinstituttet;

³: Havforskningsinstituttet;

⁴: Pharmaq Analytiq AS;

⁵: Norges miljø og biovitenskapelige universitet, NMBU

Historisk var nefrokalsinose (NK) kjent som et problem ved oppdrett av regnbueørret i vann med høye CO₂-verdier, men tilstanden er også beskrevet hos en rekke andre fiskearter. I fiskehelse rapporten fra Veterinærinstituttet har NK i flere år på rad blitt rangert som en av de største og mest økende helseutfordringene ved settefiskproduksjon av både laks og ørret.

De første synlige forandringene i fisken er hvite utfellingene i de store utførselsgangene for urin, deretter kan nyret bli mer svullent og grålig av farge. Problemene kan derimot starte før det er mulig å oppdage det ved åpning av fisken. I tidlige stadier av lidelsen vil en histopatologisk undersøkelse (studie av vev i mikroskop) kunne avdekke mineralholdig materiale i noen få av nyrets utførselsganger. Utfellingene kan etter hvert hope seg opp slik at utførselsgangene tilstoppes og utvides og vevet omkring blir påkjent med mer omfattende skader i nyret som resultat. Ganske snart oppstår også skade på cellene som dekker overflaten i utførselsgangene. I noen tilfeller har det også blitt påvist mineralutfellingene i andre organer, som pseudobrank (fiskens reduserte, første gjellebue) eller magesekk. I det FHF-finansierte prosjektet STONEHUNT som nylig ble avsluttet, har Veterinærinstituttet, Høgskulen på Vestlandet, Havforskningsinstituttet, Pharmaq Analytic og NMBU samarbeidet om å kartlegge nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom (HSS) i settefiskanlegg og gjennomført to laboratorieforsøk for å undersøke effekten av økt belastning med CO₂.

Sykdommen hemorragisk smoltsyndrom (HSS) kan også ramme laks i settefiskfasen,

gjør i rent ferskvann før og under smoltifisering. Ved HSS er det vanlig å finne blødninger til muskulatur, indre organer og til nyrets urinveier. Fordi HSS og NK i mange tilfeller blir påvist samtidig, er det blitt diskutert om HSS først gir lekkasje av blod til urinveiene og at NK utvikles sekundært. Men det kan også være omvendt, at mineral-krystaller «klammer på seg» i en ond sirkel med mer og mer krystallisering, skader og blødninger. I prosjektet ønsket vi derfor også å se på mulige sammenhenger mellom NK og HSS.

Laboratorieforsøk og CO₂

For CO₂ i vannet i settefiskanlegg har det vært anbefalt øvre grense på 15 mg/L, men i dag har mange settefiskanlegg etablert egne grenseverdier ned mot 10 til 12 mg/L. I forsøk med CO₂-verdier over 15 mg/L er det vist at laks kan utvikle nefrokalsinose under flere ulike forsøksbetingelser: i vann med både høy og lav alkalitet og ved lav vanntemperatur. Forsøk med CO₂-verdier fra 5 til 40 mg/L på postsmolt i brakkvann (12 promille) i et RAS-anlegg har vist at den fysiologiske responsen var tydelig også ved verdier under 15 mg/L, men at det ikke ble utviklet tegn til NK i løpet av den 12 uker lange eksponeringstida, selv med verdiene på 40 mg/L. Her er det tydeligvis flere faktorer som virker inn samtidig.

I prosjektet STONEHUNT gjennomførte vi to laboratorieforsøk med parr under smoltifisering. I forsøk 1 testet vi effekten av 6 uker med CO₂-verdier på 16 mg/L (9°C, 1 – 7 promille salt). Forsøk 2 varte i 10 uker med CO₂-verdier på 22 - 23 mg/L (5°C, rent ferskvann bufret med natrium bikarbonat). I forsøk 2 hadde vi også med

STONEHUNT

Prosjektnummer FHF: 901588

Prosjektnavn: Nefrokalsinose og hemorragisk smoltsyndrom: Årsakssammenhenger og muligheter for forebygging (STONEHUNT)

Start - slutt: 01.11.2019 - 29.03.2024

Ansvarlig organisasjon:

Veterinærinstituttet

Prosjektleder: Forsker Arve Nilsen, Veterinærinstituttet

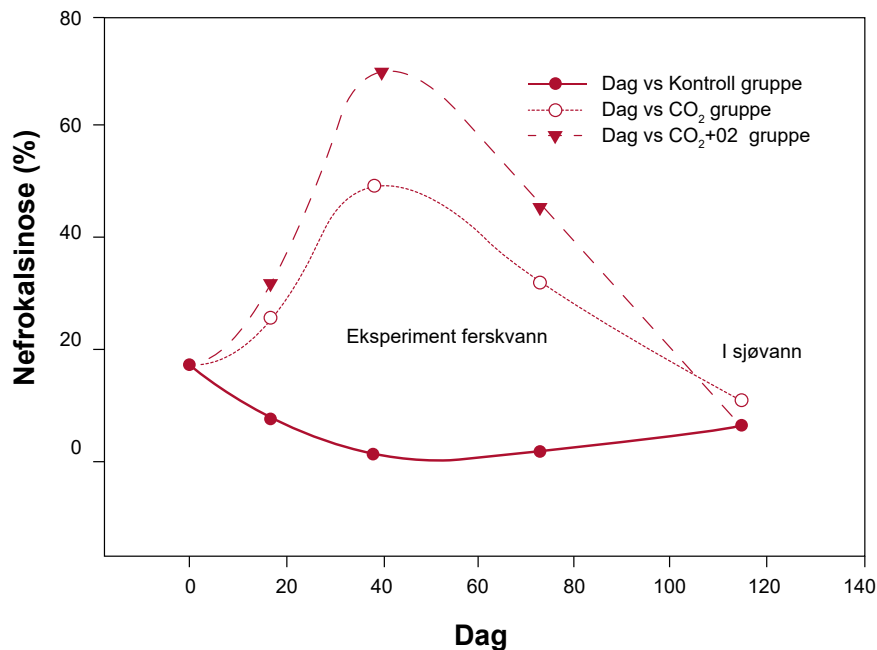
Budsjett: 13, 9 millioner

Hjemmeside: <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901588/>

Skann QR-koden under og last ned den fullstendige prosjektrapporten:



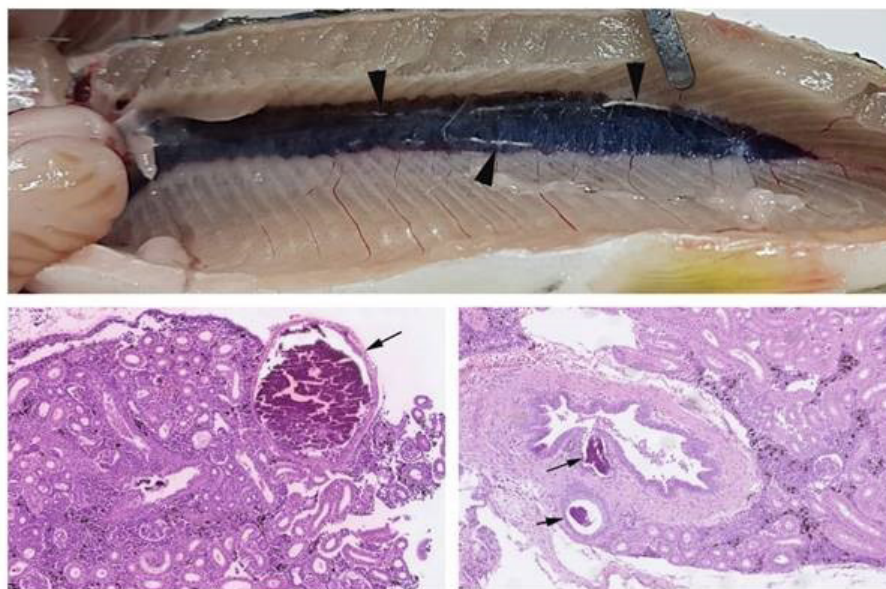
en forsøksgruppe der vi kombinerte høy CO_2 med en moderat økt oksygenmetning (125 % DO). Til begge forsøkene fikk vi inn forsøksfisk (parr) fra kommersielle anlegg, der fisken hadde NK ved ankomst til laboratoriet. Frem til oppstart av forsøket ble fisken gitt vintersignal (LD 12:12), før det ble justert til fullt lys (LD 24:0) ved oppstart. Under tilvenningsperioden i forsøkskarene var nivået av CO_2 lavt (2 – 3 mg/L), og i begge gruppene ble forekomsten av NK tydelig redusert før forsøket startet. I forsøk 1 fortsatte NK å forsvinne både i testgruppen og kontrollgruppen, mens i forsøk 2 forsvant NK nesten helt i kontrollgruppen, men økte raskt både i omfang og alvorlighet i testgruppene med 23 mg/L CO_2 (Figur 1). Da forsøkene i ferskvann var avsluttet ble fisken overført til sjøvann med lav CO_2 (2 mg/L). I forsøk 2 skjedde det da en rask reduksjon i forekomsten av NK også i de berørte testgruppene.



Figur 1. Nefrokalsinose i oppdrettsanlegget, i forsøket og i sjøvannsperioden. ● representerer kontrollgruppen, ○ er CO_2 gruppen og ▼ er $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ gruppen.

I begge forsøkene førte belastning med CO_2 under smoltifiseringen til fysiologiske endringer i fisken. Økt nivå av CO_2 i plasma førte aller først til at pH i blodet sank. Fisken kompenserte dette ved å bruke gjellene til å ta opp HCO_3^- fra vannet i bytte med Cl^- . Effekten av det var at pH i blodet økte, mens plasma Cl^- gikk ned. Ved moderat CO_2 -belastning i forsøk 1 (16 mg/L) ble det ikke påvist utvikling av NK eller HSS, men det var små og forbigående utslag på hematokrit og plasmaverdier som Na^+ , K^+ og Ca_2^+ . Det var likevel tydelige forskjeller i fysiologisk respons mellom de ulike fiskegruppene, noe som kan skyldes at fiskestørrelse og livshistorie har en betydning for hvordan fisken takler slik miljøbelastning.

I forsøk 2, der vi fikk tydelig utvikling av NK, registrerte vi også en tydelig sammenheng mellom NK og økt Ca/P ratio i nyrevevet og økt plasma Ca_2^+ . Sistnevnte ble kun påvist hos fisk som ble avlivet med bruk av anestesi. Fisk som ble eksponert for CO_2 -verdier på 23 mg/L vokste dårligere, hadde økt akkumulering av kalsium i nyre og indikasjoner på økt mineralisering av ryggvirvler. Fisk som ble utsatt for 23 mg/L CO_2 hadde lavere konsentrasjon av antioksidanten glutation i lever, noe som kan tyde på økt oksidativt stress. Det ble også påvist endret nivå av flere aminosyrer i muskelvevet hos CO_2 -eksponert fisk, noe som kan ha sammenheng med

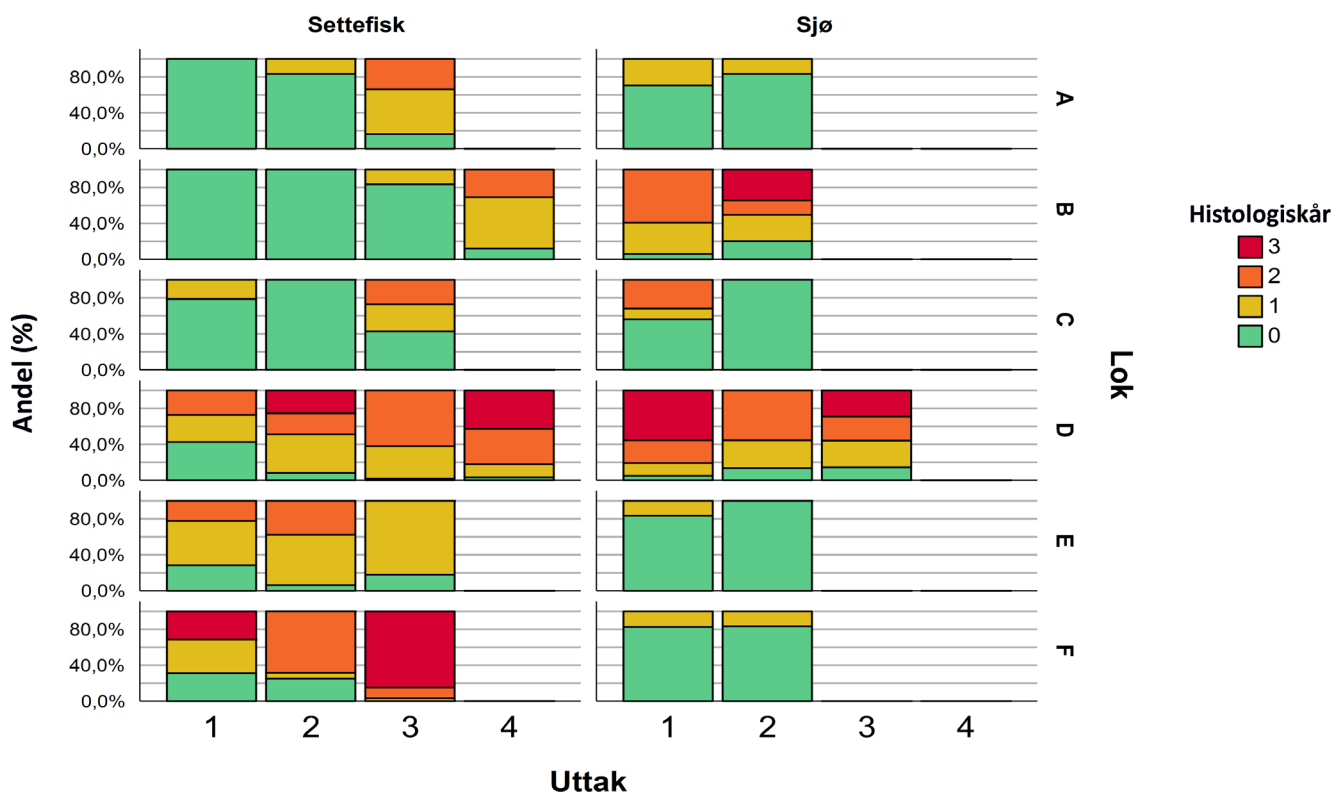


Figur 2. Nefrokalsinose. Laks fra eksponeringsforsøket med lyse striper i nyrekanten som indikerer kalkholdige utfellinger i nyrets samlerør for urin (øverste bilde). Histopatologi av dilatert samlerør med kalkholdig materiale (nederst til v., pil). Histopatologi med kalkholdig materiale i samlerør og urinleder (nederst til h., liten og stor pil).

endret energimetabolisme og redusert veksthastighet i disse gruppene.

Data fra settefiskanlegg

I en kartlegging av seks settefiskanlegg fra Vestlandet til Troms tok vi tre til fire prøveuttak fra settefiskperioden og to



Figur 3. Fordeling av histopatologisk skår (0 – 3) for nefrokalsinose (NK) fra 6 settefiskanlegg før og etter utsett i sjø. Data fra den første delen av prosjektet: 15.10.2019 – 06.11.2020, fordelt etter uttakstidspunkt og om prøvene ble tatt på fisk i settefiskanlegg eller etter utsett i sjø.

til tre uttak etter sjøsetting og utførte histopatologisk undersøkelse av nyret fra i alt 830 fisk. Vi klassifiserte funnene etter hvor mange tubuli vi fant med synlige utfellinger (NK) eller blødninger (HSS). Ingen funn ga kategori 0, 1 til 5 tubuli = 1 (mild), 6 til 20 tubuli = 2 (moderat) og over 20 tubuli = 3 (kraftig).

I ferskvann fant vi en gjennomsnittlig prevalens (forekomst) av NK på 35,8%, med spredning fra 8,3 til 64,3%. Flesteparten av skadene var milde (kategori 1). De mest alvorlige skadene fant vi i anlegg som også hadde høy prevalens. Det var samtidig store forskjeller mellom anleggene og mellom de ulike prøveuttakene (Figur 3). Lignende tall for NK ble også funnet i en studie av NK i 11 settefiskanlegg i Midt-Norge. NK kunne påvises i store deler av produksjonstida, men det var tydelig at forekomsten økte gjennom vinteren fram til tidspunktet for sjøsetting. Som regel forsvant NK etter sjøsetting, men i noen tilfeller var det mulig å påvise skader i lengre tid. I to anlegg som ble fulgt opp

med ukentlige prøveuttak så vi at det også kunne være store variasjoner i prevalens av NK i tida mellom de faste hoveduttakene i prosjektet.

Ved feltkartleggingen gjorde helse-tjenestene som tok ut prøvene til histologi også en visuell vurdering av graden av NK, etterens skåringsmal (kategori 0 til 5) utviklet av Marin Helse. Når slike vurderinger blir gjort av erfarne fiskehelsepersonell er det et ganske godt samsvar mellom visuell skåring og histologi. De tidlige nyreforandringene som kan påvises ved histologi som utfellinger i noen få nyretubuli, er likevel vanskelige å oppdage ved obduksjon. HSS oppdages gjerne i langt framskredne tilfeller ved at fisken blir syk med bleike gjeller og blødninger, mens nyreblødningene er vanskelige å oppdage ved obduksjon. Det anbefales derfor å ha et system for regelmessig uttak av nyrevev for histologisk undersøkelse for å kunne oppdage NK og HSS i en tidlig fase, og for på den måten si noe sikkert om når lidelsene først dukker opp i anlegget.

I vannprøvene som ble tatt fra anleggene ble det påvist ganske stabil kvalitet. Verdiene for CO_2 lå under 15 mg/L, $\text{NH}_3\text{-N}$ under 12 $\mu\text{g/L}$ og det var jevnt over en lav til moderat salinitet. Men en svakhet med studien var at vi ikke fikk gode nok serier med prøvetaking, og det kan ha vært variasjoner underveis som ikke ble registrert. De patologiske forandringene vi fant i fisken fra de kommersielle anleggene var av samme type som det vi så i laboratorieforsøket (Forsøk 2). I begge tilfellene fant vi også en del fisk som hadde symptomer på både NK og HSS, men stort sett hadde fisk med kraftig NK lite HSS, og omvendt. I grupper med både NK og HSS så det ut til at NK ble påvist før HSS og også hadde en tidligere sykdomstopp.

Ved uttakene i felt ble det registrert vekt, lengde og utseende og samtidig tatt blodprøve for å måle hematokrit (blodprosent) og plasma som ble undersøkt for albumin, kalsium, natrium, klorid og fosfor. Fisk med påvist NK hadde samme

vekt og lengde som frisk fisk, mens fisk med HSS var signifikant større. Fisk med HSS hadde tydelig redusert hematokrit og konsentrasjon av plasma albumin, noe som er en naturlig konsekvens av en slik blødersykdom. NK ga litt mindre reduksjon i hematokrit og ingen effekt på plasma albumin. Plasmaverdiene for øvrig var i hovedsak innenfor det som er vist i andre undersøkelser fra felt. Den tydeligste sammenhengen var redusert plasma klorid hos fisk med NK i settefiskfasen og variasjoner i plasma kalsium og fosfor hos fisk med HSS.

Sammensetning av nyrestein

I histologien kan vevsprøver farges med en spesialmetode som gir kalsiumsalter en sterk brunfarge. Dette kan brukes for å skille nyrestein fra annet materiale som kan forekomme i nyretubuli. Ved en nærmere kjemisk analyse av stein fra forsøk 2 og fra feltmaterialet i STONEHUNT fant vi at de besto av fosfatsteiner, der det også var kalsium, magnesium, karbon og nitrogen (Dahlitt, struvitt og brushitt). Urinen må være basisk for at disse fosfatsteinene skal dannes. Normal pH i urin hos laks er anslått å være 7,5 og forholdene kan derfor ligge ekstra godt til rette for slike utfellinger hos laks.

Våre funn samsvarer med det som er sett i andre undersøkelser, og stemmer også godt overens med ideene om at NK har en sammenheng med endringer i fiskens osmoregulering, syre/base-balanse og mineralomsetning.

Konklusjoner og anbefalinger

Nefrokalsinose er en utbredt lidelse i norske settefiskanlegg for laks, der prevalens og alvorlighetsgrad som regel øker gjennom produksjonstida fram mot sjøsetting. Etter utsett i sjø ser det ut til at sykdomsutviklingen stopper opp. Fisk med alvorlige skader dør, mens det hos fisk med mer moderate skader ser ut til at skadene kan avheles over tid. I kartleggingen i prosjektet STONEHUNT ble det funnet fisk med tydelig NK også ved andre og tredje uttak i sjø. I fiskehelsesrapporten fra Veterinærinstituttet blir det også rapportert om påvisning av NK hos stor laks og regnbueørret i sjø.

Fisk som hadde NK ved levering til laboratorieforsøkene ble gradvis friskere i akklimatiseringsperioden i vann med lavt CO₂ i tida før forsøkene startet. I forsøk 1, med 16 mg/L CO₂, ble prevalens av NK ytterligere redusert i både kontrollgrupper og forsøksgrupper. I forsøk 2, med 23 mg/L CO₂, økte prevalens og alvorlighetsgrad av NK i forsøksfisken, for så å synke igjen når konsentrasjonen av CO₂ avtok ved overføring til sjøvann. Forsøkene viste også at økt konsentrasjon av CO₂ i vannet, til verdier på 16 mg/L eller mer, ga en rask endring i blodets syre-base balanse. Etter langvarig og kraftig eksponering (23 mg/L) ble tilveksten redusert, og det ble påvist til dels omfattende fysiologiske endringer i fisken.

Fisk med store nyreskader og fysiologiske forstyrrelser kan dø av NK, men også de milde og moderate gradene indikerer et fysiologisk stress og en negativ påvirkning av fiskens velferd. Høy prevalens og fortsatt økende problemer med NK i kommersielle settefiskanlegg er urovekkende og bør føre til større innsats med overvåking og forebygging. Å følge opp med obduksjoner av både syk og frisk fisk er viktig, men for presis og tidlig påvisning anbefales også regelmessige histologiske undersøkelser av nyrevev.

I tillegg til nivået av CO₂ kan tidligere livshistorie og flere andre driftsfaktorer også ha betydning for hvordan fisken takler slike endringer i vannkvaliteten. Det er derfor viktig å gjøre en standardisert loggføring av viktige drifts- og vannkvalitetsparametere, som blant annet temperatur, salinitet, gassbalanse, nitrogenforbindelser, fisketetthet og vannutskifting. For å bruke disse opplysningene må dataene kunne spores til fiskegrupper og kar slik at opplysninger om fiskehelse og data fra overvåkingen av NK, og eventuelt også HSS, kan analyseres i samme datasett. For vurdering av hvordan sykdommen påvirker fiskens velferd og prestasjon i sjøfasen er det også viktig å følge fiskegrupper etter utsett •

Fullstendig referanseliste kan fås ved henvendelse til forfatterne.