



Fakultet for Veterinærmedisin
Veterinærhøyskolen
Institutt for basalfag og akvamedisin
Seksjon for akvamedisin og ernæring

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fordypningsoppgave 2019, 20 stp

Varmtvannsbehandling av atlantisk laks – effekt på hud og andre ytre overflater

Exposure of Atlantic salmon to warm water – effect on skin / external surfaces

Ellingsen, Synne
Moljord, Marianne
Kull 2014

Evensen, Øystein

Innhold

Sammendrag	4
Definisjoner	5
Innledning.....	6
Oppdrettsnæringen i Norge	6
Lakselus (<i>Lepeoptheirus salmonis</i>)	6
Skottelus (<i>Caligus elongatus</i>)	8
Behandling mot lakselus i Norge	8
Mekanismer bak resistens	9
Dagens situasjon.....	9
Overvåkningsprogram	10
Resistenstesting	11
Termisk behandling mot lakselus.....	11
Thermolicer®	12
Optilice®.....	13
Anbefaling	13
Termisk toleranse hos teleoster (atlantisk laks)	13
Fiskens ytre overflate	14
Hudens oppbygning.....	14
Gjellenes oppbygning.....	16
Finnenes oppbygning	17
Velferd hos laksefisk.....	18
Relatert forskning	20
Formålet med oppgaven	21
Materiale og metoder	21

Materiale.....	21
Metode.....	21
Forsøk 1.....	22
Forsøk 2.....	24
Preparering av histologiske snitt	24
Histologisk vurdering.....	25
Statistiske metoder	32
Resultater.....	33
Adferdsendringer ved behandling	33
Statistiske resultater.....	33
Diskusjon.....	40
Adferdsendringer ved behandling	40
Behandlingsmetode	40
Effekt av anestesimiddel	41
Variasjon i prøvetakingsprosedyre.....	42
Antall snitt per fisk.....	43
Begrensninger og generaliserbarhet	43
Begrensninger.....	43
Generaliserbarhet	44
Konklusjon	45
Takk til bidragsyttere.....	45
Summary	46
Referanser.....	48
Vedlegg	49

Sammendrag

Tittel: Varmtvannsbehandling mot lakselus – effekt på hud og andre ytre overflater

Forfattere: Ellingsen Synne We, Moljord Marianne

Veileder: Evensen, Øystein, Institutt for basalfag og akvamedisin (BasAm)

Termisk avlusing av atlantisk laks (*Salmo salar*) utgjør i dag den vanligste formen for ikke-medikamentell behandling mot lakselus. Det diskuteres mye om denne formen for behandling er dyrevelferdsmessig akseptabel, og om hva slags effekter den eventuelt har på laksen.

Formålet med denne oppgaven er å kartlegge om varmtvannsbehandling av laks gir skader på laksens ytre overflater, herunder finner, gjeller og hud. Det er ønskelig å studere om temperatureksponeringen i seg selv er skadelig for fisken, når faktorer som trengning og mekanisk skade i størst mulig grad ekskluderes. Forsøket ble utført som en eksperimentell intervensjonsstudie, hvor individene ble utsatt for vanntemperaturer på 28-34°C i 30 sekunder. Det ble tatt vevsprøver fra hud, finner og gjeller som vurderes histologisk. Resultatene viser ingen signifikant effekt på ytre overflater. Videre forskning bør se på hvordan håndtering, trengning og mekanisk påvirkning under termisk behandling påvirker forandringer på ytre overflater og hvordan dette avspeiles i eventuelle histopatologiske forandringer.

Definisjoner

Tabell 1. Definisjoner

Bevegelige lus	Lakselus (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>) i stadiene preadult I, preadult II og adult. Selv om kjønnsmodne hunnlus er bevegelige, kategoriseres dem for seg selv
Fastsittende lus	Lakselus (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>) i stadiene chalimus I og chalimus II
Infeksjon / infestasjon	Begrepene benyttes om hverandre for å beskrive infeksjon av laks med ulike stadier av lakselus
Kjønnsmodne lus	Adult hunnlus av arten lakselus (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>), med eller uten eggstrenger
Poikilotherm/ vekselvarm	En organisme med en kroppstemperatur som holder en likevekt med temperaturen i miljøet
Patogen	Sykdomsfremkallende organisme
Resistens	En genetisk betinget motstandskraft mot legemidler hos en organisme
Smerte	Ubehagelig sensorisk eller følelsesmessig opplevelse assosiert med faktisk eller potensiell vevsskade, eller beskrevet som dette (IASP 1979, oversatt).
Toksin	Giftstoff
Toleranse	Evnen til å tåle ulike påvirkninger, for eksempel kjemiske stoffer eller endringer i temperatur
Xenobiotika	Kjemisk substans i en organisme som ikke er naturlig produsert av organismen, eller forventet å være tilstede i organismen

Innledning

Oppdrettsnæringen i Norge

Norge produserer i dag over halvparten av all atlantisk oppdrettslaks i verden, og i 2018 ble det eksportert laks for 67,8 milliarder kroner [1]. Det oppdrettes flere arter i Norge, men laks er den arten det produseres mest av [2]. Med økende produksjon og økte kvalitetskrav til laksen har næringen møtt på problemer, og gjennom effektivisering og utvikling preges norsk oppdrettsnæring av intensiv drift. Dette setter et press på næringen, og flere nye utfordringer har oppstått med tanke på blant annet velferd og helse hos fisken [3]. De mest sentrale utfordringene er i dag høy dødelighet, lakselus, velferd hos rensefisk og sykdomsproblematikk [4].

Lakselus (*Lepeoptheirus salmonis*)

Lepeoptheirus salmonis, heretter lakselus, er den viktigste ektoparasitten norsk oppdrettsnæring står ovenfor per dags dato, grunnet dens mulighet til å smitte mellom villaks og oppdrettsfisk [4](s. 94-95). Overvåkning og behandling av lakselus koster næringen enorme summer, anslagsvis 5-8 milliarder årlig, og det pågår mye forskning for å finne alternative eller nye intervensjoner mot luseinfeksjon.

Lakselus er et krepsdyr som lever i saltvann, og infiserer laksefisk, som atlantisk laks og sjøørret [5]. Den er naturlig forekommende på den nordlige halvkule, og livnærer seg av hud, slim og blod fra fisken [6]. Den fører til økt slimproduksjon, som gjør at fisken får grålige partier der lusen forekommer. Lusen spiser seg gjennom epitelet og kan lage store erosjoner i huden, noen ganger helt ned til muskulaturen. Ved større infestasjoner kan fisken få problemer med

osmoregulering, i tillegg til at en svekket hudbarriere vil øke risikoen for sekundærinfeksjoner [5](s. 96).

Lengden på lusas livssyklus er temperaturavhengig, og den er kortere med økende temperaturer. Syklusen består av 8 livsstadier som skilles med skallskifter, henholdsvis nauplius I og II, copepoditt (infektivt stadium), chalimus I og II, preadult I og II før den når kjønnsmoden voksen lus i form av hann eller hunn [7]. Nauplius er et frittlevende planktonisk stadium, copepoditten fester seg til fisken og er det infektive stadiet, chalimus er et fastsittende stadium der den livnærer seg av hud og slim, mens preadult og voksen er bevegelige stadier [7]. Paring mellom voksen hunnlus og hannlus foregår gjennom hele året, men skjer hurtigere med økende temperaturer [8]. Den voksne hunnen kan legge opptil 11 par eggstrenger, der hver streng består av flere hundre befruktete egg [4]. Eggene klekker og frigis i vannet som nauplier [7].

Forekomsten av lakselus hos atlantisk laks varierer gjennom året. I 2018 var det et høyest antall av preadulte og voksne hanner på våren, og høyest antall av voksne hunnlus på høsten [4]. I forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg, heretter Lakselusforskriften hjemlet i Matloven, stilles det krav til rutinemessig telling, der «*det skal telles lakselus i tre følgende stadiegrupper: a) voksen hunnlus, b) bevegelige stadier og c) fastsittende stadier*» [9](Vedlegg 1). De fastsittende stadiene finnes særlig på hodet, nakkeparti og bakover på ryggen [5](s. 96). Oppdrettere teller lus ukentlig, og skal rapportere inn antall lakselus for hver telling [9]. I Lakselusforskriften er det også oppgitt grenseverdier som omfatter hvor mange lus som er tillatt per fisk, og det er to ulike grenser, en grense på våren, hvor kravet for igangsetting av behandling er 0.2 kjønnsmodne hunnlus/fisk, og en annen grense, 0.5 kjønnsmodne hunnlus/fisk, resten av året. Det tolereres mindre lus per fisk om våren av hensyn til den ville

laksesmolten som vandrer ut av elvene [4]. Oppdrettere er nødt til å gjennomføre tiltak for å hindre et høyere antall lakselus/fisk enn det Lakselusforskriften tillater.

Skottelus (*Caligus elongatus*)

Caligus elongatus, heretter skottelus, er en annen ektoparasitt som infiserer laks. Skottelusen har en mindre vertsspesifisitet enn lakselusen, som gjør at oppdrettslaksen kan bli smittet fra villfisk som torsk og sei. Skottelusen er mindre i størrelse, og derfor fører den til mindre skade enn lakselusen. Den forårsaker sjelden store sår, men det har vært registrert omfattende punktblødninger. Den er mer mobil enn lakselusen, og forflytter seg raskt fra fisk til fisk. Skottelusen bekjempes på samme måte som lakselus, men på grunn av deres forflytningsevne hender det at de forsvinner av seg selv og infiserer for eksempel villfisken utenfor [10].

Behandling mot lakselus i Norge

Det har i stor grad blitt brukt medikamentell behandling mot lakselus i Norge. Mange midler har blitt brukt, med de fem hovedgruppene organofosfater (azametiphos), pyretroider (cypermethrin og deltamethrin), avermektin (emamectin benzoate), benozyl-ureaforbindelser (diflubenzuron og teflubenzuron) og desinfeksjonsmiddelet hydrogenperoksid. Azamethiphos inhiberer enzymet acetylcholin esterase, som fører til en fatalt langvarig muskelkontraksjon. Pyretroider interfererer med åpning og lukking av spenningsstyrte natriumkanaler, som fører til eksitasjon med påfølgende paralyse. Emamectin benzoate virker også på nervesystemet. Benozyl-ureaforbindelser hemmer kitin-syntese, og hydrokenperoksid har per dags dato en udefinert effekt på ektoparasitter [11].

De siste årene har en fått redusert effekt av behandling med medikamentelle midler, på grunn av resistens hos lakselusen. Derfor har næringen måtte komme med andre metoder for å holde kontroll på lakselusen, disse har blitt kalt ikke-medikamentelle behandlinger. Fysiske barrierer

(luseskjørt), laser, funksjonelle fôr, ferskvann, varmtvann, mekanisk børsting og spyling er metoder som har blitt tatt i bruk [11].

Mekanismer bak resistens

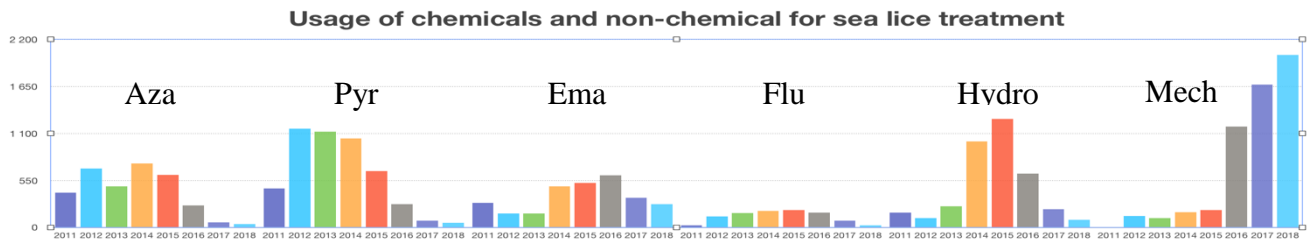
Resistens mot xenobiotika utvikles evolusjonært ved genetiske mutasjoner. Ved genetisk diversitet vil de ulike genetiske kombinasjonene gi bedre beskyttelse mot ulike kjemikalier. I fravær av eksponering til kjemiske toksiner, vil de genetiske kombinasjonene som har resistens ha lav frekvens i populasjoner. Ved gjentatt eksponering av samme kjemikalium vil individer med genetiske kombinasjoner som bærer resistensgenet/-ene ha et konkurransemessig fortrinn, og selekteres frem. Dette resulterer i en populasjon med en høyere frekvens av resistensgener. Utviklingshastigheten til en resistent populasjon avhenger av flere ulike faktorer, slik som resistensmekanismens potens, frekvensen og intensiteten på bruken av kjemikalier, samt biologiske faktorer hos individet som holder resistensgenene, som i dette tilfellet er lakselus. Andre viktige faktorer er totalantall lus som eksponeres for kjemoterapeutika innenfor et område, samt lusens kapasitet til å spre gener [12].

Dagens situasjon

Resistens hos lakselus har vært et kjent problem i Norge siden 1990-tallet, men begynte først å bli et alvorlig problem rundt år 2007. Antall medikamentelle behandlinger begynte å reduseres i 2015. Resepter for medikamenter mot lakselus hadde en 61% reduksjon fra 2016 til 2017, mens mengden ikke-medikamentelle behandlinger økte med 47% i den samme perioden. Ikke-medikamentelle behandlinger og forebyggende tiltak er derfor den dominerende behandlingsmetoden for lakseluskontroll per i dag. Termisk avlusing stod for 74% av ikke-medikamentelle behandlinger i 2017. I årsrapporten publisert av Veterinærinstituttet i 2017 vises det resistens mot deltametrin, azametifos og emamectin-benzoat langs norskekysten. Det

er mindre resistens mot hydrogenperoksid enn andre medikamenter, men i flere områder er det sett en lavere sensitivitet også mot dette.

I Figur 2 er det gitt en oversikt over bruken av lakselusmidler til oppdrettsfisk fra 2011 til 2018, inkludert mekanisk behandling.



Figur 1. Oversikt over foreskrevet kjemisk og ikke-medisinsk behandling i Norge 2011-2018. Disse tallene er fra de Folkehelseinstituttet offisielle statistikk og er også presentert i Fiskehelsesrapporten 2018 [1]. Tallene angir antall foreskrivninger og ikke mengde av aktiv-substans. Aza – Azametifos, Pyr - pyretrorider, Ema - Emamectin, Flu – deflubenzuron og teflubenzuron, Hydro – hydrogen peroksyd, MECH – mekanisk, ikke-medikamentell [4].

Overvåkningsprogram

Veterinærinstituttet overvåker følsomhet og resistens mot legemidler hos lakselus. Overvåkningsprogrammet har som formål å gi en best mulig beskrivelse av lakselus sin følsomhet mot legemidler, samt gi råd om bruk av legemidler for å kontrollere lakselus hos oppdrettsfisk. Overvåkningsprogrammet startet opp i 2013, og Veterinærinstituttet publiserer årlig en rapport over situasjonen i Norge. Programmet består av en passiv og en aktiv overvåkning. Den passive overvåkingen sammenfatter resepter som skrives ut for medikamentelle tiltak mot lakselus, samt rapporter om resistens. Den aktive overvåkingen består av toksikologiske eller molekylære resistenstester som gjennomføres på lakselus fra 75 oppdrettsanlegg langs norskekysten [13].

Resistenstesting

Resistenstesting kan utføres på to ulike måter. Bioassays, eller toksikologiske resistentester, gjennomføres på levende parasitter. Det brukes en standardisert protokoll for hver substans, og identisk utstyr brukes. Testingen gjennomføres ved å utsette levende, bevegelige lakselus som er fjernet fra fisken for to ulike konsentrasjoner av hvert kjemikalium, pluss en sjøvannskontroll. Etter å ha vært utsatt for kjemikaliene i 24 timer i sjøvann, beregnes mortaliteten hos de ulike stadiene og kjønn (preadult I og II, adulte hanner og hunner). Mortaliteten i lave konsentrasjoner brukes for å indikere sensitiviteten i populasjonen, hvor mortalitet over 80% indikerer en sensitiv populasjon. Mortaliteten ved høye konsentrasjoner brukes for å indikere forventet utfall ved en behandling med kjemikalet.

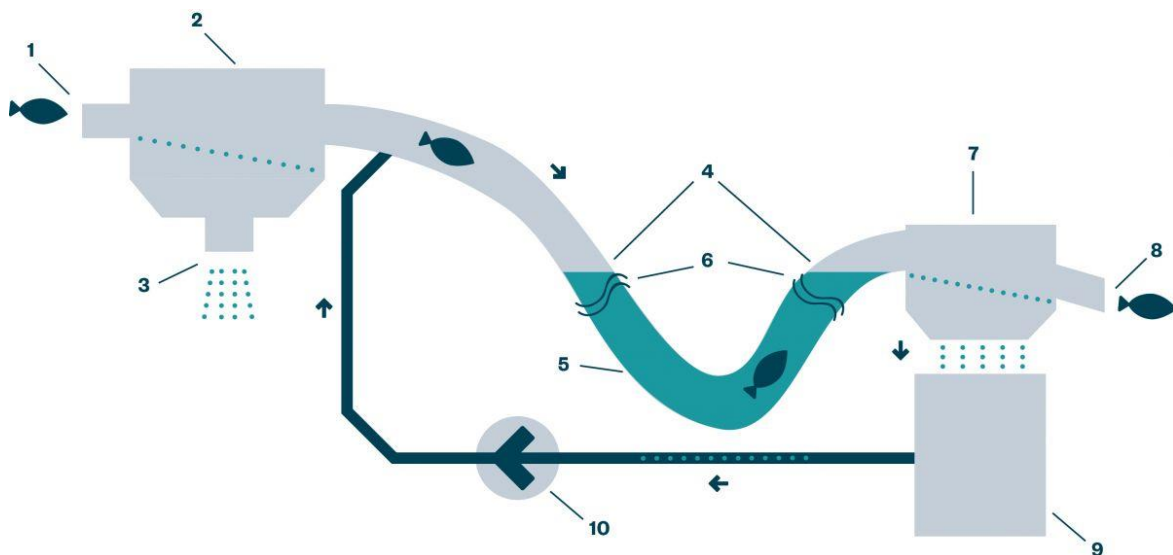
Molekylær resistentesting gjøres hos Patogen Analyse AS, som analyserer de genetiske karakteristika med hensyn til pyretroid-, azametifos- og hydrogenperoksid-resistens ved bruk av PCR. Resultatene forteller om lusene er sensitive, delvis sensitive eller resistente overfor medikamentene, samt prosent forventet effektivitet ved behandling ved bruk av hydrogenperoksid [13].

Termisk behandling mot lakselus

Termisk behandling utgjør i dag den vanligste formen for ikke-medikamentell behandling av laks og regnbueørret mot lakselus. Det er to behandlingsprinsipper som er basert på varmtvannbehandling mot lakselus; Thermolicer® og Optilice®. Prinsippet er det samme, og går ut på at laksen holdes i vann på 28-34°C i ca. 30 sekunder. Ved disse vanntemperaturene vil lusen inaktiveres og falle av. Laksefisk kan derimot tåle temperaturer på 30-34 grader for en kortere periode [14], [15].

Thermolicer®

Thermolicer® er en maskin produsert av selskapet Steinsvik AS som utfører badebehandling av fisk mot lakselus. Prinsippet går ut på en plutselig økning i vanntemperatur, en behandling som «inaktiverer» lusen og får den til å falle av. Maskinen (Figur 1) er montert på brønnbåter eller lekter. Den har en kapasitet på å behandle 80 tonn per time, avhengig av lokale forhold og trengsel. Fisken pumpes opp og fraktes gjennom maskinen. Sjøvannet filtreres og slippes ut, før fisken utsettes for vann som holder 30-34 grader i 25-30 sekunder. Fisken blir så sluppet tilbake i merden. Behandlingsvannet filtreres, luftes, tilsettes oksygen, varmes opp og gjenbrukes [16].



Figur 2. Thermolicer® av Steinsvik AS. 1. Fisken entrer Thermoliceren etter pumping. 2. Vannseparasjon. 3. Sjøvann blir filtrert og sluppet ut. 4. Fisken utsettes for lunkent vann. 5. Behandlingsløyfe. 6. Vannoverflate. 7. Separator for behandlingsvann. 8. Fisken forlater maskinen. 9. Oppvarmet vann sirkuleres til vanntanken for filtrering, lufting og oppvarming. 10. Behandlingsvannet pumpes tilbake til behandlingsløyfen (8). Thermolicer® består av behandlingskammer, sirkulasjonspumpe, sensorer, varmeelementer og utstyr for lufting og oksygenering av behandlingsvannet. I tillegg er det plassert et rotasjonsfilter på utsiden av selve maskinen som sørger for en kontinuerlig filtrering av behandlingsvannet for å ta ut lus som har løsnet fra fisken (8).

Optilice®

Optilice® er et produkt produsert av Optimar AS, som fjerner lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) og skottelus (*Caligus elongatus*) fra laks og regnbueørret ved bruk av temperert vann og spyling. Fisken fraktes gjennom maskinen som inneholder enten saltvann eller ferskvann med en temperatur på 28-34 grader i 20-30 sekunder. 98% av bevegelige pre-adulte og adulte lakselus skal ifølge selskapet inaktiveres og falle av, før lusa fanges opp og destrueres. Selskapet reklamerer med at behandlingen ikke påfører noen negative effekter på fisken [17].

Anbefaling

Termisk avlusing har tidligere blitt anbefalt som et alternativ til legemidler som bør brukes sammen med andre tiltak for å få en helhetlig strategi mot lus. Resultater viser at termisk avlusing gir betydelig reduksjon av antall bevegelige og voksne lus. Beregnet reduksjon av bevegelige lus ligger på 75-100%. Tidligere forsøk utført av Veterinærinstituttet med nyeste versjonen av Thermolicer® utført på regnbueørret viste ingen signifikante akutte skader hos fisken, og en lav dødelighet. Veterinærinstituttet konkluderte med at de største utfordringene dermed var relatert til trengning og pumpesystemet, og ikke det varme vannet i seg selv [18].

Termisk toleranse hos teleoster (atlantisk laks)

Fisk er obligat poikilotherme dyr, som kan oppfatte temperaturendringer mindre enn 0.5 grader. Opptil 90% av varmeoverføringen skjer direkte over kroppsveggen, i tillegg til at gjellene effektivt driver med varmeutveksling. Ved en økende vanntemperatur vil det oppstå en termisk likevekt i fisken. Denne likevekten er litt forsinket, og akkurat hvor forsinket denne er, er avhengig av kroppsmassen. Store fisk vil derfor ikke påvirkes av små og fluktuerende endringer i vanntemperatur. Dette er muligens en av årsakene til at plommeseekkyngel og rogn har en

lavere temperaturtoleranse enn parr og smolt, og derfor er mer følsomme for en endring i vanntemperatur.

Selv om det kan være store forskjeller i vanntemperatur, har hver fiskeart en optimumstemperatur. Elliot [14] undersøkte temperatur-intervallet for høyest overlevelse, appetitt og vekst hos blant annet atlantisk laks. Kritisk temperatur for overlevelse ble fastsatt som den temperaturen hvor 50% av individene døde. Hos atlantisk laks ble kritisk temperatur fastsatt til å være fra -0.8 grader celsius til 30-33 grader celsius. Øvrige temperaturgrenser for andre ulike utviklingsstadier står i tabell 1.

Tabell 3. Ulike temperaturgrenser for alle stadier av atlantisk laks (*Salmo salar*), ørret (*Salmo trutta*) og røye (*Salvelinus alpinus*) [19].

	<i>Salmo salar</i>		<i>Salmo trutta</i>		<i>Salvelinus alpinus</i>	
	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper
Eggs	0	16	0	13	0	8
Alevins						
Incipient	0-2	23-24	0-1	20-22	0-0.3	19-21
Ultimate	0-1	24-25	0	22-24	0-0.2	23-27
Parr + smolt						
Incipient	0-2	22-28	0-0.7	22-25	0-1	22-23
Ultimate	-0.8	30-33	-0.8	26-30	-1.0	26-27
Feeding	0-7	22-28	0.4-4	19-26	0.2	21-22

Fiskens ytre overflate

Hudens oppbygning

Huden (*cutis*) hos fisk er bygget opp av epidermis og dermis, med underliggende underhud (*subcutis*). Epidermis (overhud) består av ikke-keratinisert, flerlaget plateepitel dekket med slim. Tykkelsen på huden varierer fra 3-25 cellelag ulike steder på kroppen. En essensiell

forskjell mellom pattedyr og teleoster, er at teleostenes ytre epidermale lag ikke keratiniseres og opprettholder funksjonen til celledeling, noe som er sentralt i sårheling [20].

Malpighiske celler er de mest tallrike i epitelet. Dette er pigmentholdige celler med mikrorygger på den apikale overflaten som holder slimer på plass på fiskens overflate. Huden er dermed dekket av et slimlag produsert av slimceller i epitelet. Slimet inneholder glykoproteiner og antimikrobielle substanser som bidrar i immunsystemet, og fungerer derfor som en beskyttende barriere mot smittestoffer, samt mot mekanisk slitasje [21]. Ellers er epitelet bestående av slimceller, immunceller og andre celletyper som club cells og sacciform cells.

Dermis (corium, lærhud) består hovedsakelig av kollagent bindevev. Langs stamme og hale deles bindevevet i et øvre, løst *stratum spongiosum* med skjell i skjellommer, og et dypere, tettvevd *stratum compactum*. I tillegg inneholder dermis pigmentceller og celler som bidrar i immunsystemet. Skjellene er en del av dermal-skjelettet, og bidrar som viktige mineralagre på lik linje med skjelettet [22]. De er plassert i et takstein-mønster, hvor den kraniale delen av skjellet ligger under den kaudale delen av skjellet framfor. Etersom skjellene feste er dypt nede i huden, vil det ved skjelltap oppstå små sår. Ved uttalt skjelltap kan fisken utvikle problemer med osmoregulering samt ha økt risiko for infeksjoner.

Under dermis ligger subcutis (underhud). Dette laget består av løstvevd bindevev og rikelig med fettceller, og er trolig viktig for bevegelse av hud i forhold til underliggende muskulatur [21].

Hud og slimhinner er det eneste som skiller innsiden av fisken mot omgivelsene og potensielt sykdomsframkallende patogener. En intakt hudbarriere er derfor sentralt i fiskens

førstelinjeforsvar mot sykdom. Fiskens evne til sårheling er temperaturavhengig, og en redusert vanntemperatur vil senke hastigheten på alle biologiske prosesser, inkludert sårheling. Slike åpne sår i hud kan fungere som inngangsport for bakterielle infeksjoner [23].

I et forsøk utført på atlantisk post-smolt i 2019 vises det at også stress er en viktig faktor hos sårheling hos laks. Det ble påvist store forskjeller i sårheling hos stressede laks i motsetning til hos laks som har vært i et så tilnærmet stressfritt miljø som mulig. Fisk som ble utsatt for stress, fikk en sårheling med en unormal epidermalvekst, redusert slimdannelse og tydelig forsinket sårheling og skjell-dannelse [24]. I smitteforsøk utført på laks, ble det vist at både et slimlag og en intakt hud er essensielt for optimal beskyttelse mot patogene agens. Også hos fisk hvor epitelet var intakt, men slimlaget var fjernet, ble det registrert en økt dødelighet etter eksperimentell smitte [25]. Som tidligere nevnt er en intakt hudbarriere sentralt for opprettholdelse av fiskens væskehomeostase. I saltvann vil laksen ha lavere osmolaritet enn omgivelsene. Dette medfører at vann passivt vil sive ut av fisken ved passiv osmose, og fisken står i fare for og dehydreres. Dette forhindres ved å drikke store mengder vann, skille ut konsentrert urin og ha en aktiv utskillelse av salter over gjellene. Ved en brutt hudbarriere vil vann raskere kunne sive ut, noe som gjør at fisken må arbeide hardere for å opprettholde væskebalansen [22].

Gjellenes oppbygning

Gjellene har funksjon som fiskens respiratoriske organer, samt at de har stor betydning for fiskens vann- og saltbalanse (osmoregulering). Gjellene ligger utsatt til for både dårlig vannkvalitet og fysiske påkjenninger, og selv moderate skader og ødeleggelser av gjellevevet kan medføre store respirasjonsproblemer og redusert evne til stresshåndtering [26].

Teleoster har fire par gjellebuer og fem gjellespalter som strekker seg fra gulvet til taket i munnhulen. Gjellebuene danner en komplett kurv rundt den bakre delen av munnhulen, og danner en V-form med en spiss som peker kaudalt [26]. Hvert par med gjellebuer er støttet opp med et skjelett bestående av brusk eller bein som er assosiert med tverrstripede adduktor- og abduktor-muskulatur, som fasiliterer bevegelse av gjellene [20].

På hver gjellebue er det tett med gjellefilamenter, som er flate horisontale utvekster. Disse er igjen forsynt med gjellelameller, som har som funksjon å gi gjellene størst mulig funksjonell overflate for å effektivisere respiratoriske og ekskretoriske funksjoner [20]. Det er i gjellelamellene at selve gassutvekslingen foregår. Lamellene er bygget opp av et tynt plateepitel, samt pillarceller som er forsterkede celler i kapillærveggen. Blodet fra de tilhørende gjellearteriene vil føres gjennom gjellekapillærene, og det tas opp oksygen, samt at det utskilles karbondioksid og ammoniakk [26].

Finnenes oppbygning

Fiskens finner er sentrale for posisjonering og fremdrift i vannet. Mens bryst- og bukfinner er parede, er rygg-, hale-, fett- og gattfinne er uparede. Oppbygningen av de ulike finnene har litt variasjoner, men generelt består de av en kjerne med bindevev og/ eller skjelett (finnestråler) dekket med epidermis. Finnenes skjelett kan deles inn i to deler: en utvendig, distal finnestråle og en innvendig, proksimal *pterygophor* (finnestråle-bærer). Finnestråle-bærerne fungerer som muskelfestepunkt for musklene involvert i bevegelse av finnene. Fettfinnen er en liten finne plassert dorsalt i medianplanet, og karakteristisk for artene i laksefamilien. Den mangler skjelett, men inneholder bindevev og en liten mengde fettvev [21].

Velferd hos laksefisk

Inntil 2014 fantes det en egen fiskesykdomslov; *Lov om tiltak mot sykdom hos fisk og andre akvatiske dyr*. Per i dag er denne opphevet, men de generelle bestemmelsene og prinsippene gjelder for de akvatiske dyrene som omfattes av dyrevelferdsloven §2, og dette er fisk, tiftokreps, og blekksprut. Dyrevelferdsloven har som formål å sikre god dyrevelferd hos dyr, og ifølge §3 har dyr en egenverdi uavhengig av nytteverdien de måtte ha for mennesker. Den samme paragrafen sier også at dyr skal behandles godt og beskyttes mot unødige påkjenninger og belastninger [27].

Målinger av velferd hos dyr i dag er basert på “*husdyras 5 friheter*”, som er de første velferdskriteriene for husdyr som ble publisert i Brambell-komiteen i Storbritannia i 1965. Disse fem kriteriene er listet i tabell 4. I dag brukes hovedsakelig tre definisjoner som grunnlag for å vurdere dyrenes velferd, og disse er basert på dyrenes biologiske funksjon, subjektive opplevelse og muligheten for et naturlig liv (se tabell 4).

Tabell 4. Oversikt over velferdskriterier for husdyr, samt de tre definisjonene på dyrevelferd.

<i>Velferdskriterier</i>	<i>Definisjoner på dyrevelferd</i>
<ul style="list-style-type: none">• Frihet fra sult, tørst og feilernæring• Frihet fra ubehag• Frihet fra frykt og stress• Frihet fra skade og sykdom• Frihet til å utøve normal atferd	<ul style="list-style-type: none">• Dyrenes biologiske funksjon: basert på helse og produksjon.• Dyrets subjektive opplevelse av sitt daglige miljø: basert på følelser og opplevelser.• Muligheten for et naturlig liv og mulighet for å utøve normal artsspesifikk atferd.

Flere av velferdskriteriene er svært vanskelige å vurdere. I praktisk bruk i dag brukes derfor såkalte velferdsindikatorer, som er objektive målinger for å kunne gradere graden av velferd.

Disse kan være indirekte ressursbaserte, og se på tilgangen dyrene har til visse ressurser, eller de kan være direkte dyrebaserte, og se på for eksempel forekomsten av ulike lidelser og sykdommer [28].

Operative velferdsindikatorer (OVI) er velferdsindikatorer som er egnet til bruk i oppdrett og håndtering av fisk. Kriterier for disse er at de må måle velferd, være repeterbare og sammenliknbare, og være lette å måle på et oppdrettsanlegg. De bør også gi en rask indikasjon på velferdsstatus. Eksempler på operative velferdsindikatorer som brukes i oppdrettsnæringen i dag er listet i tabell 5. OVI'er som må sendes til et sentralt laboratorium for evaluering kalles laboratoriebaserte velferdsindikatorer (LABVI'er).

Tabell 5. Eksempler på operative velferdsindikatorer som brukes i næringen i dag for å vurdere velferd [29].

<i>Operative velferdsindikatorer</i>	<i>Eksempler</i>
Dyrebaserte, Individbaserte	Gjellelokkrate, antall lakselus, bleke gjeller, tilvekstfaktor, øyeblikning, snoteskade, skjelltap
Dyrebaserte, Gruppebaserte	Dødelighetsrate, appetitt, atferd
Miljøbaserte	Temperatur, salinitet, oksygenmetning, pH

Både Dyrevelferdsloven §8 og Akvakulturdriftforskriften §20 fastslår at metoder og utstyr som skal benyttes til dyr skal være utprøvd og funnet egnet til bruk ut ifra et dyrevelferdsmessig hensyn. Men det finnes ingen klare kriterier for hvordan man skal kunne dokumentere at ny teknologi er velferdsmessig forsvarlig [27, 30]. Hvilken grad av skade som er innenfor et velferdsmessig akseptabelt nivå er derfor et vanskelig og omdiskutert tema. I rapporten om termisk avlusing av laksefisk publisert av Veterinærinstituttet er ikke dette temaet diskutert [18].

Relatert forskning

I 2018 fikk Havforskningsinstituttet (HI) og Veterinærinstituttet (VI) i oppdrag av Mattilsynet å vurdere eventuell smerte hos laks ved termisk avlusing i etterkant av at Mattilsynet hadde mottatt flere meldinger om skade og død av laks ved slik behandling [31]. Dette resulterte i to artikler publisert september 2019. Den ene artikkelen omhandlet laksens adferdsresponsen når fisken ble flyttet fra vann med 8°C til vann som holdt ulike temperaturer opp til 38°C. Studien viste at laks som ble flyttet til temperaturer over 28°C fikk en høyere svømmehastighet, og atferden var karakterisert ved kollisjoner og hoderisting. Det ble konkludert med at laks overført til slike temperaturer viste responser som indikerer nosisepsjon og/eller smerte [32].

Den andre artikkelen publisert i denne sammenhengen omhandlet et forsøk hvor det ble studert termiske skader hos atlantisk laks i gjelle, øyne, hjerne, nesehule og tymus ved behandling i 34-38°C i 72-140 sekunder. Artikkelen konkluderte med at en slik behandling kan gi direkte vevsskader i disse organene, samt en risiko for termisk smerte og fluktreaksjoner [33]. En slik behandling som beskrevet over er både over lengre tid og ved høyere temperatur enn hva som brukes ved termisk avlusing i industrien i dag. I juni 2018 ble det derimot gjennomført et skadeforsøk ved Havforskningsinstituttets stasjon i Matre, ved temperaturer på 34°C i 30 sekunder. Dette er standard temperatur og tid som brukes under avlusing i næringen, og hensikten ved skadeforsøket var å undersøke om slik behandling gir akutte vevsskader hos laks. Den foreløpige konklusjonen på forsøket viste ingen umiddelbare makroskopiske forandringer med unntak av finneskader, men det ble observert tydelig adferdsrespons i forbindelse med eksponering [34].

Formålet med oppgaven

Formålet med oppgaven er å undersøke for skadelige effekter på hud, gjeller og finner hos atlantisk oppdrettslaks (*Salmo salar*) ved bruk av varmtvannsbehandling mot lakselus. Vannet var av samme temperatur og behandlingen ble gjennomført med lik varighet som ved en typisk varmtvannsbehandling (Thermolicer eller Optilice). Dette ble utført som en eksperimentell intervensjonsstudie, hvor siktemålet var å redusere betydningen av konfunderende faktorer som trenging og stress, slik at resultatet viser betydningen av selve varmtvannet på hud og ytre overflater.

Materiale og metoder

Materiale

Det foreliggende forsøket ble utført som en prospektiv intervensjonsstudie.

Studieenhet: atlantisk oppdrettslaks (*Salmo salar*) tilvendt sjøvann, gjennomsnittsvekt 353g

Studieutvalg: 54 laks. 24 individer per forsøk, samt 6 individer i kontrollgruppen.

Utstyr: elektrisk varmeelement, benzokain til avliving, tilgang på sjøvann (32-34‰), prøvetakingsutstyr (skalpell, pinsett, saks), håv, beholdere til vevsprøver som fikseres i formalin, termometer, og tidtaker.

Metode

Det ble foretatt et randomisert utvalg av fisk basert på atlantisk laks stasjonert på Solbergstrand forsøkslaboratorium. Fiskene ble fordelt i to grupper i to ulike kar for forsøk 1 og 2, med 24 individer per forsøk. I tillegg ble det tatt ut en kontrollgruppe på 6 individer, som ble plassert i samme kar som individene i forsøk 1.

Karene var like store og med lik utforming, samt lik vanntilgang. Vannet holdt en temperatur på 8.5-9 grader, samt en salinitet på 33.8 ‰. Fisken ble fôret likt, og ble ikke sultet før forsøket. Karene var plassert i samme rom, og ble usatt for lik håndtering. Forsøk 1 og 2 ble utført i løpet av fire dager, hvor det andre forsøket ble startet opp dagen etter forsøk 1. Fiskene i de to forsøkene ble til enhver tid holdt i ulike kar, for å best mulig få til to uavhengige forsøk. Videre følger en detaljert beskrivelse av forsøkene.

Forsøk 1

Kontrollgruppen (n=6) ble avlivet med en overdose benzokain, dette for å unngå å påføre mer skade på hud og gjeller ved avliving med slag mot hodet. Fisken ble fanget med håv og overført til et kar med 45 liter vann tilsatt 90 ml utblandet benzokain (>200 mg/L). Fisken ble livløs etter 1-5 minutt.

Følgende vevsprøver ble tatt ut: finneprøver fra ryggfinne, halefinne, gattfinne, bukfinne, brystfinne og fettfinne, gjelleprøve fra andre gjellebue venstre side, samt tre hudsnitt på 1x1cm fra skalletaket, 2 cm kranialt for ryggfinnen og 2 cm kaudalt for ryggfinnen (bilde 1).

Vevsprøvene ble fiksert i prøveglass med 15-20 ml formalin, der prøvene fra hvert individ ble lagt i individuelle prøveglass, markert med tid etter varmtvannsbehandling, dato og individnummer.



Figur 3. Bildet illustrerer hvor hudsnittene ble tatt. De tre hudsnittene ble tatt fra hhv. skalletaket, 2 cm kranialt for ryggfinnen og 2 cm kaudalt fra ryggfinnen.

Intervensjonsgruppen ble utsatt for varmtvannsbehandling. For å behandle fisken ble et kar med 50L vann varmet opp. Samme vannkilde ble benyttet for alle forsøk. Oppvarmingen av vannet ble gjennomført ved bruk av et elektrisk varmeelement, hvor vi overvåket temperaturøkningen med et termometer, illustrert i figur 2. Varmeelementet ble tatt ut av karet når vannet nådde en temperatur på 34 grader, ettersom dette er angitt øvrig temperaturgrense for termisk behandling av laks.

Individene (n=24) ble fanget opp med håv og holdt i luften i ca. 3 sekunder før de ble plassert i karet med det oppvarmede vannet. De ble holdt i luften for at vann fra håv og fisk skulle få renne av seg for å holde temperaturen i det oppvarmede karet så stabil som mulig. Fisken ble utsatt for varmtvann i 30 sekunder, før de ble fanget opp med håv og plassert i et nytt kar, med tilsvarende vanntemperatur og kvalitet som i det opprinnelige karet. Det ble varmebehandlet 6 individer av gangen, og tiden ble tatt med stoppeklokke fra det sjette individet ble håvet opp og overført til varmtvannskaret. Fisken ble nøye observert under eksponeringen for varmtvann, inkludert svømmeadferd.

Hele behandlingen tok 9 minutter, og ved slutten av behandlingen holdt vannet 28 grader. Avliving og prøveuttak ble gjennomført 1, 3, 24 og 48 timer etter varmtvannsbehandling.

Før hver prøvetaking ble fisken (n=6 pr uttak) avlivet i det samme karet med benzokain som brukt for kontrollgruppen. Det ble tatt ut samme vevsprøver som hos kontrollgruppen, men ved makroskopiske forandringer ble det bakerste hudsnittet erstattet med hudsnitt med forandringer. Samme fiksering og behandling av vevsprøvene som nevnt ovenfor.

Forsøk 2

Det ble benyttet samme prosedyre som i forsøk 1. Det ble ikke tatt ut kontroller i forsøk 2. og Et annet unntak var at det ble behandlet færre individer av gangen. I stedet for å fylle behandlingskaret med 6 individer per behandlingsrunde, ble håven fylt med fisk kun én gang per behandlingsrunde. Det resulterte i en lavere tetthet per behandling i behandlingskaret. Ved starten av behandlingen holdt vannet 34 °C. Hele varmtvannsbehandlingen tok 15 minutter, og ved endt behandling holdt vannet 29 °C.

Til avliving ble det brukt 200 mg/ml benzokain, 30ml i et 45 liter vannkar.

Preparering av histologiske snitt

Alle vevsprøvene ble lagt i formalinbeholdere markert med individnummer, tidsgruppe og forsøk 1 eller 2. Prøvene ble sendt til Veterinærinstituttet for preparering og snitting [20].

Prosessering

Prøvene ble fiksert i 10% fosfat-bufret formalin i minst 24-48 timer. Videre blir prøvene dehydrert ved bruk av alkohol (opp mot 100% alkohol), før de ble overført til xylene. Dette steget, hvor prøvene er utsatt for løsemidler, kalles «clearing», og er helt nødvendig før innstøping. Dette er fordi prøvene ikke kan utsettes for parafin mens de enda inneholder

alkohol, da alkohol og parafin ikke blandes. De dehydrerte prøvene infiltreres med varm parafinvoks som holder 58-60 °C, før de plasseres i en støpe-form i romtemperatur [20].

Snitting

Etter tørking av parafin-blokken, skjæres snittene i skiver, 3-5um tykke, som plasseres på objektglass [20].

Farging

Prosedyren ved farging inkluderer blant annet fjerning av parafinrester i snittene i en prosess som kalles de-parafinisering, samt en rehydrering av snittene. Rehydrering av snittene er nødvendig for å kunne få en korrekt farging. Farging av snittene gjøres for å lettere kunne identifisere og skille mellom ulike celler og vev. Fargen som ble brukt i dette forsøket, var hematoxylin og eosin (HE). Hematoxylin farger cellekjernen og andre acidotiske strukturer slik som RNA-rike deler av cytoplasma, lysosomer, ribosomer og endoplasmatisk reticulum, blå. Eosin vil farge cytoplasmatiske proteiner og en del andre extracellulære strukturer i en rødlig farge. Etter at snittene er farget, blir det lagt på et dekkglass, og prøvene undersøkes i mikroskop [20].

Histologisk vurdering

Innledningsvis ble det sett over flere av snittene i kontrollgruppen, samt fra 24-timers og 48-timers gruppene, uten at de ble gradert. Dette ble gjort for å få en oversikt over graden av patologiske forandringer som kunne forventes å være tilstede i de ulike vevssnittene. Til histologisk vurdering av snittene brukte vi en 4cm lang VAS-skala (visuell analog skala) for hvert snitt. Det ble satt et kryss på linjen ut ifra hvor mange og hvor uttalte patologiske forandringer vi fant på snittene.

Graderingen baserte seg på tilstedeværelse av ulike patologiske forandringer; både hvor mange ulike forandringer som ble funnet, men også utbredelsen av de enkelte. Dette var en subjektiv vurdering, og ikke basert på kvantitativ telling. I tabell 3 og 4 er det listet opp de vanligste patologiske forandringene som ble observert i de ulike snittene. Hud- og finnesnittene har blitt satt sammen i én tabell, da det ble observert mange av de samme forandringene i disse snittene.

Tabell 3. Patologiske forandringer i gjellesnitt

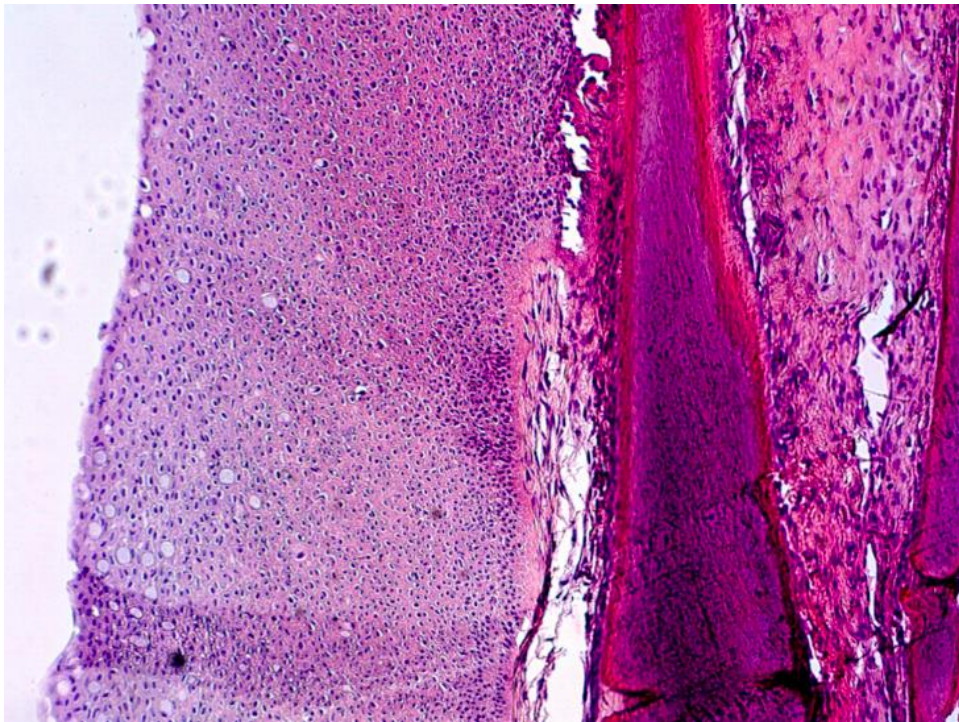
<i>Patologisk forandring</i>	<i>Beskrivelse</i>
Clubbing	En betegnelse som beskriver epitelial proliferasjon av epitelcellene ytterst på sekundærlamellene i gjellene. Fører til dannelse av et tykkere, “klubbe-formet” utseende på sekundærlamellene. Er en vanlig forandring, som sees ved kronisk irritasjon av gjelleepitelet.
Aneurismer	Skade på indre karstrukturer og svekkelse av pilarceller i sekundærlamellene. Blant annet stress vil føre til økt hemodynamisk trykk i svekkede lameller, som fører til utposninger fra blodkarene med mulighet for påfølgende blødning.
Nekroser	Celledød, som alltid skyldes en skadelig påvirkning. Cellekjernen kan sees histologisk på tre ulike måter, pyknose, karyolyse, karyorhexis. Ved pyknose kondenserer DNA, som gjør at en ser en liten basofil masse. Ved karyolyse oppløses DNA ved hjelp av DNA-aser og RNA-aser, som gjør at en ser en svakt farget cellekjerne. Karyorhexis er når en pyknotisk cellemembran rupturerer, som gjør at cellekjernen fragmenteres. Sluttresultatet på en nekrotisk celle vil være en hypereosinofil, kjerneløs masse.

Tabell 4. Patologiske forandringer i snittene fra hud og finner.

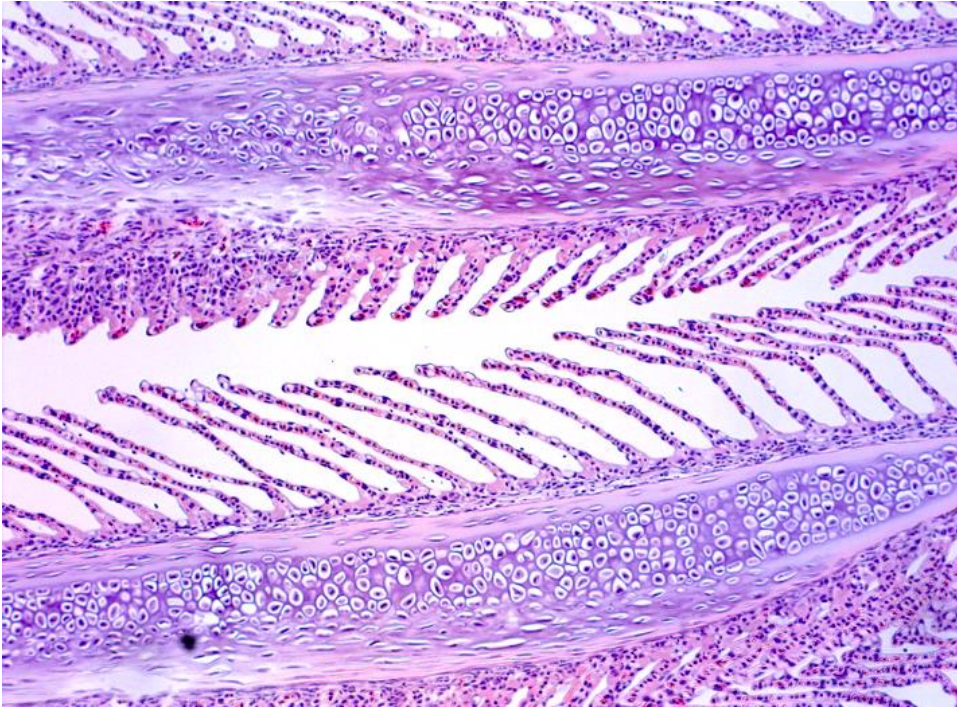
<i>Patologisk forandring</i>	<i>Beskrivelse</i>
Nekrose	En form for celledød som alltid skyldes en skadelig påvirkning. Cellekjernen kan sees histologisk på tre ulike måter; pyknose, karyolyse, karyorhexis. Ved pyknose kondenserer DNA, som gjør at en ser en liten basofil masse. Ved karyolyse oppløses DNA ved hjelp av DNA-aser og RNA-aser, som gjør at en ser en svakt farget cellekjerne. Karyorhexis er når en pyknotisk cellemembran rupturerer, som gjør at cellekjernen fragmenteres. Sluttresultatet på en nekrotisk celle vil være en hypereosinofil, kjerneløs masse.
Infiltrasjon av betennelsesceller	Ulike betennelsesceller som strømmer til vevet som følge av en betennelse. Ved en akutt betennelse ser en mest nøytrofile granulocytter og makrofager, mens en ved kronisk betennelse ser mest lymfocytter. Granulocyttene har en lappedelt kjerne, og nøytrofile har svakt eosinofilt cytoplasma. Lymfocyttene har store, basofile kjerner med lite cytoplasma.
Ødem	Ved en betennelsesreaksjon økes karpermeabiliteten til kapillærene, samt at blodtilførselen økes til området. På grunn av økt hydrostatisk trykk og økt karpermeabilitet siver det væske ut fra blodkarene – eksudasjon. Denne væsken legger seg ekstracellulært i vevet, og en kan se det histologisk med frasprenge strukturer og økt avstand mellom cellene.

Snittene ble vurdert uavhengig av hvilken tidsgruppe og fra hvilket forsøk de tilhørte. Hvert snitt ble mikroskopert på 4x, 10x og 40x. Da alle snittene var studert ble linjene målt med linjal, og snittet fikk en gradering fra 0-4 basert på linjalmålingen. Snittene som ble scoret 0.0 fant vi ingen patologiske forandringer hos. Snittene som fikk score 2.0 eller høyere hadde forandringer på over halvparten av vevet og/eller svært uttalte forandringer i områder.

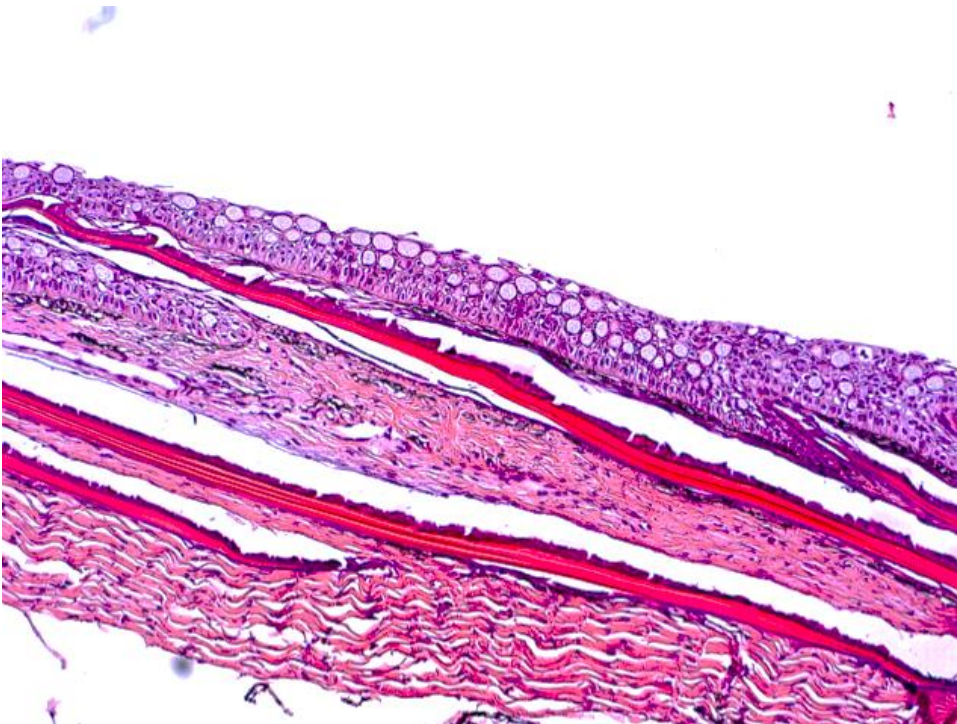
Figur 2-6 er eksempler tatt fra vårt materiale, med medfølgende scoring/gradering og begrunnelse. Bildene er tatt i lysmikroskopi på 10x forstørrelse.



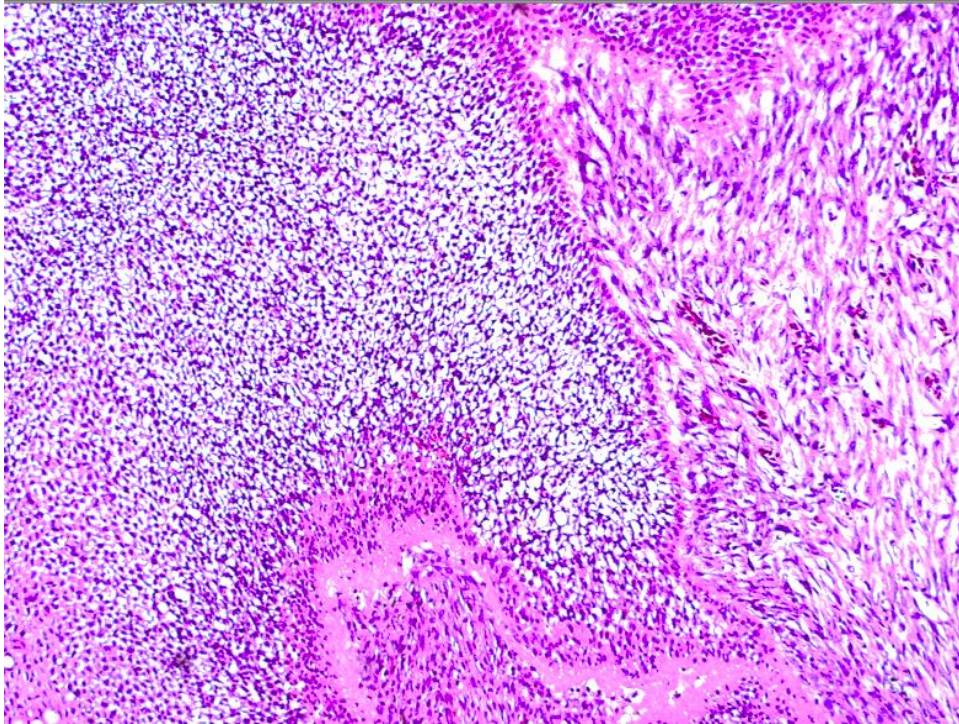
Figur 4. Kontrollgruppe, fisk 4, finne. H&E. Score: 0.0. Normal cellemorfologi og vevsstruktur.



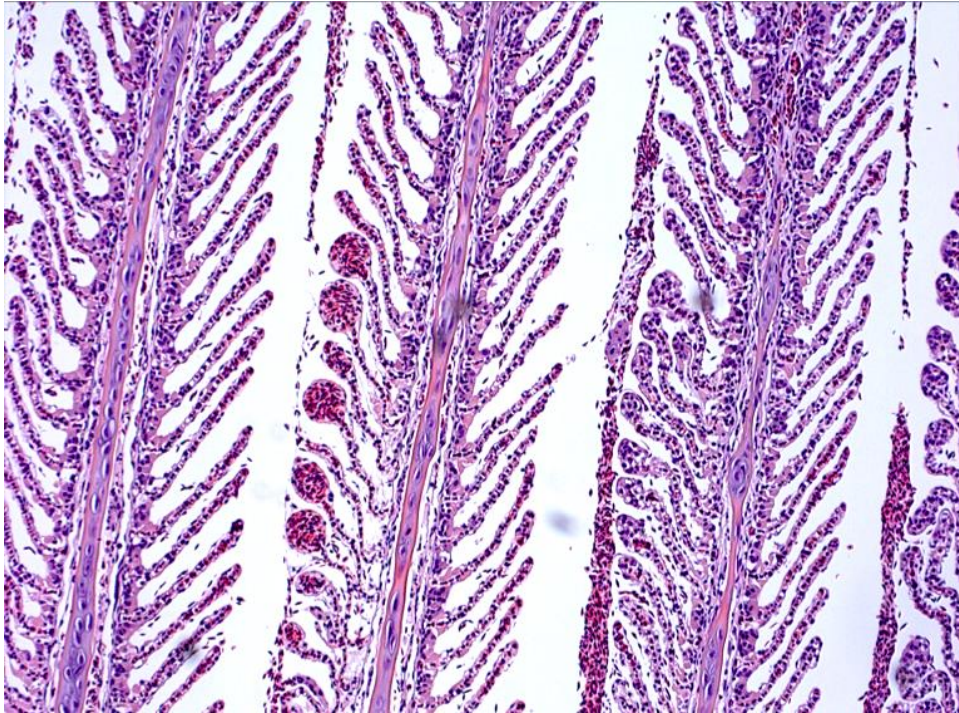
Figur 5. Kontrollgruppe, fisk 6, gjelle. H&E. Score: 0.0. Normale, slanke lameller.



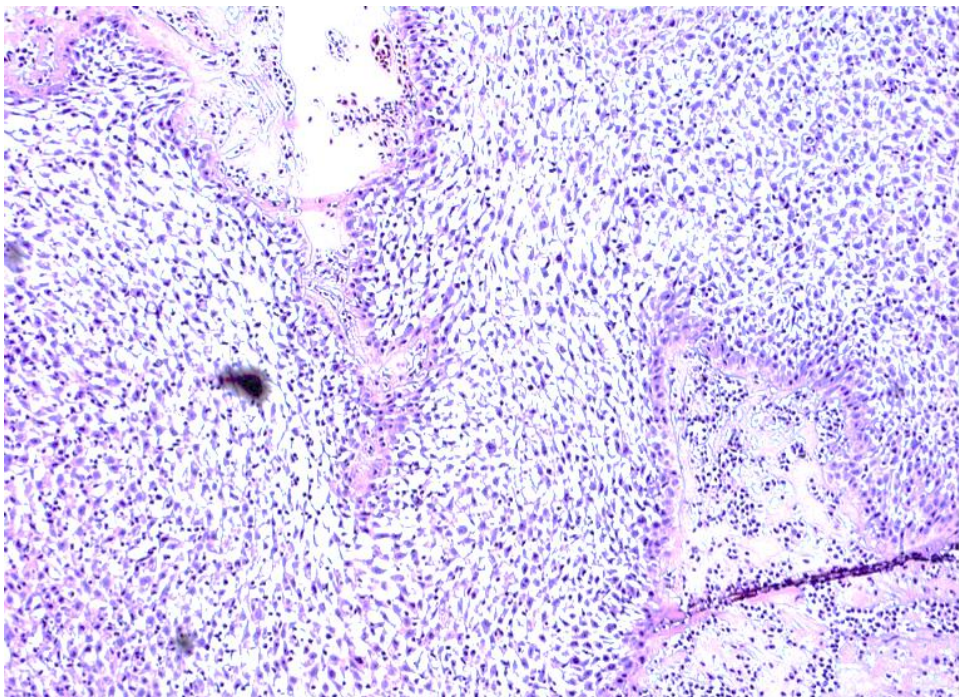
Figur 6. Kontrollgruppe, fisk 1, hud. H&E. Score: 0.0. Normal vevsstruktur og cellemorfologi.



Figur 7. 3 timers prøve, fisk 6, forsøk 1, finne. H&E. Score: 2.5. Uttalt tilstedeværelse av ødem over store deler av snittet. Over halvparten av epitelet hadde betydelig ødemdannelse.



Figur 8. 24 timers prøve, fisk 2, forsøk 2, gjelle. H&E. Score: 2.0. Tydelige aneurismer i sekundærlamellene, samt områder med clubbing.



Figur 9. 48 timers prøve, fisk 1, forsøk 2, hud. H&E. Score: 1.5. Ødemdannelse i store områder.

Statistiske metoder

Etter gradering hadde hvert individ 10 scoringer: 1 gjellescore, 3 hudscoringer og 6 finnescoringer. For behandlingen av dataene ble det tatt gjennomsnitt av hudscoringene og finnescoringene, slik at hvert individ fikk 3 scoringer hver: 1 gjellescore, 1 hudscore og 1 finnescore.

For måling av eventuell assosiasjon mellom varmtvannsbehandling og skade på ytre overflater over tid, ble det brukt en regresjonsanalyse (Stata15). Her ble de kontinuerlige, avhengige variablene finnescore, hudscore og gjellescore analysert for forandring over tid hvor 'tid' er en uavhengig, ikke-kontinuerlig variabel.

Resultater

Adferdsendringer ved behandling

Det ble observert utilpass og stresset fisk under varmtvannsbehandlingen. Fisken slo mot vannoverflaten, og ble oppfattet som svært stresset. Det ble ikke observert slik adferd når den ble flyttet tilbake til sitt opprinnelige kar som holdt 9°C, eller når den ble overført til karet med benzokain. Det ble dog ikke utført en systematisk vurdering og karakterisering av dette, kun subjektive observasjoner.

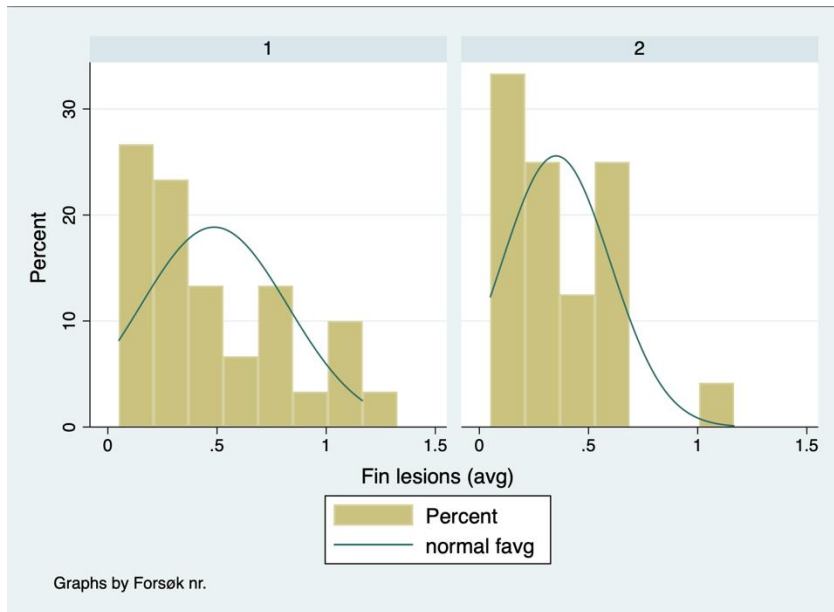
Statistiske resultater

Dataene i dette forsøket er basert på funn hos totalt 54 individer fordelt i ulike grupper, og i to uavhengige forsøk. Fordelingen av antall individer per gruppe vises i tabell 5.

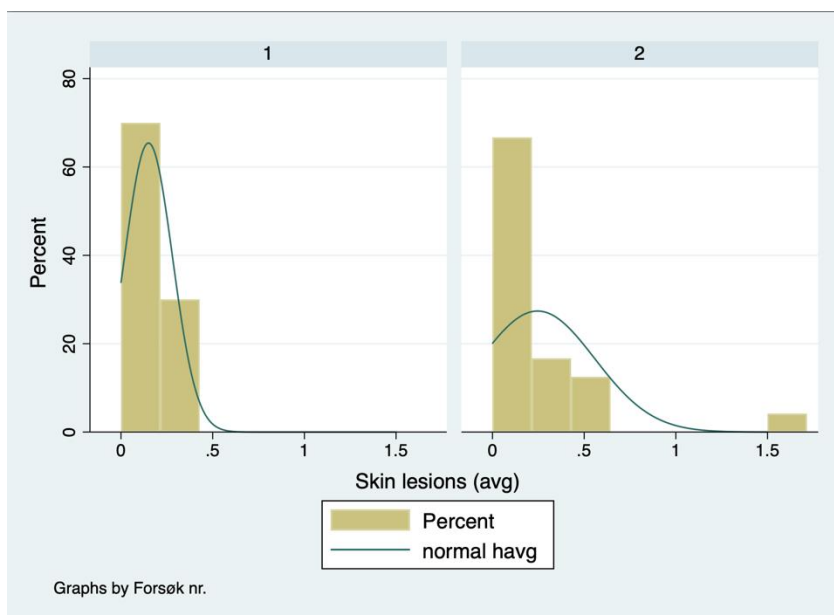
Tabell 5. Fordelingen av antall individer i forsøk 1 og 2, samt i gruppene basert på tid etter eksponering.

Time post exp	Forsøk nr.		Total
	1	2	
0	6	0	6
1	6	6	12
3	6	6	12
24	6	6	12
48	6	6	12
Total	30	24	54

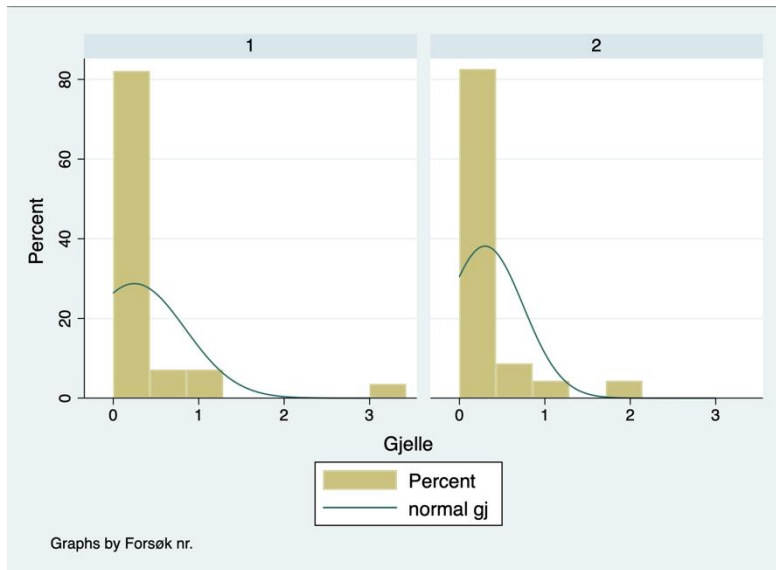
Resultatene fra forsøk 1 og 2 på finne-, hud- og gjellescoring blir sammenliknet i hhv. figur 8, 9 og 10.



Figur 10. Fordelingen av score for finnelesjoner i forsøk 1 og 2. Individene i forsøk 1 hadde jevnt over en høyere score, og dermed større histopatologiske forandringer. Det er også større spredning av resultatene i forsøk 1.



Figur 11. Fordelingen av score av hudlesjoner i forsøk 1 og 2. Individene i forsøk 2 hadde en svakt forhøyet score i forhold til individene i forsøk 1.



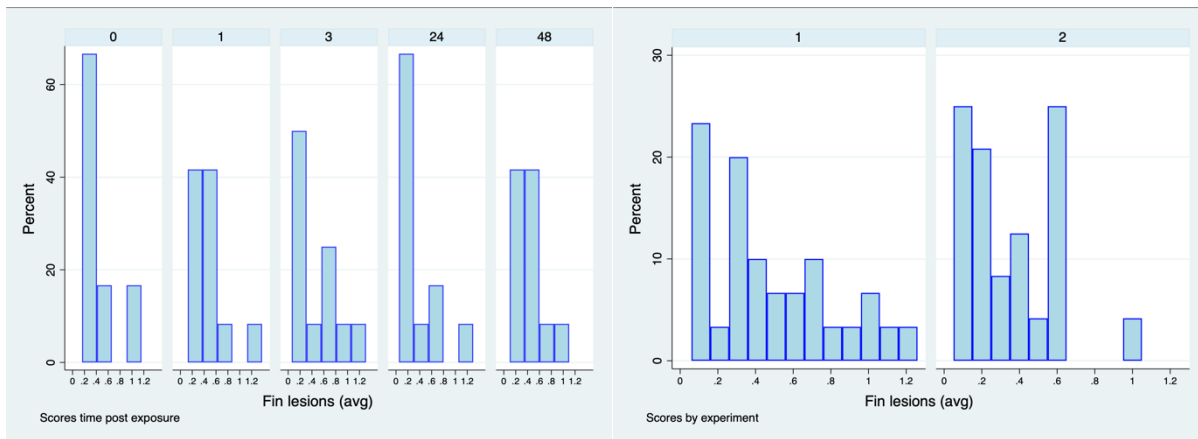
Figur 12. Fordeling av score for gjellelesjoner i forsøk 1 og 2. Omtrent 90% av individene i både forsøk 1 og 2 hadde en score mellom 0 og 1. Det er lite variasjon mellom resultatene i de to forsøkene.

Det er lite variasjon mellom resultatene i de to forsøkene når det kommer til scoring av hud- og gjelleforandringer. Dette tyder på en god repeterbarhet mellom de to forsøkene.

Derimot er det større variasjon for scoringen av finnesnittene i de to forsøkene, med betydelig større spredning av resultatene i forsøk 1.

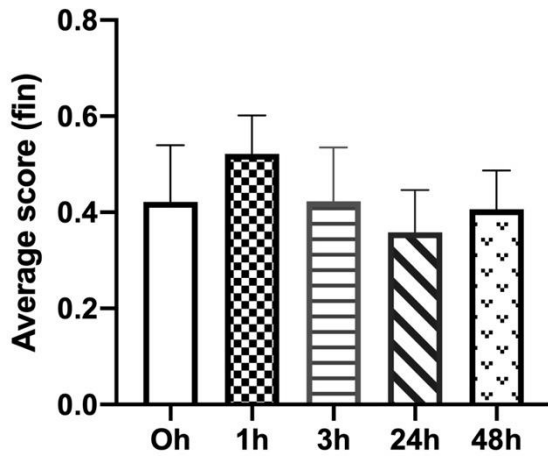
I figur 10, 11 og 12 vises sammenhengen mellom antall snitt, score og forsøk for hhv. finne-, hud- og gjelle. De to forsøkene er presentert i hver sin graf, og grafene viser fordelingen av score med andel i prosent.

I figur 13a er resultatene fra begge forsøkene samlet, slik at det er gjennomsnittscoren til 12 individer ved hvert tidspunkt, med unntak av 0-prøven (kontrollgruppen) som består av 6 individer. Figur 13b vises finne-score pr forsøk og med en finere inndeling langs x-aksen enn i figur 11.



a)

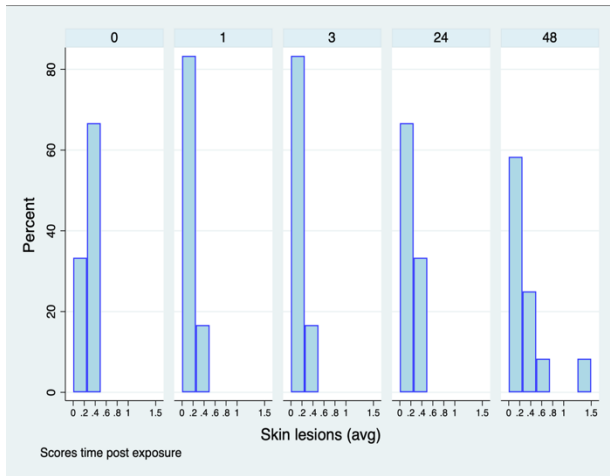
b)



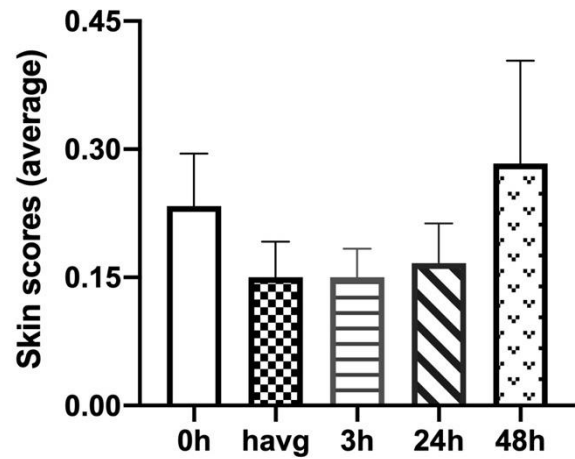
c)

Figur 13. a) Fordelingen av score av finnelesjoner for de ulike uttakstidspunktene og for de to forsøkene. Figuren viser at flesteparten av prøvene hadde lave scoringer, uten tydelige tendenser til en endring over tid. b) Finnelesjon (score) for de to forsøkene, 1=forsøk nr. 1 og 2=forsøk nr. 2. c) Her vises gjennomsnittlig finnescore ved de ulike tidspunktene etter behandling (0h = kontroll, før behandling) Det er ulik fordeling av score for de to forsøkene.

Figur 14 og 15 viser samlede resultater for henholdsvis hud og gjelle, samt gjennomsnittet for hud (figur 14b). Det er generelt lave score og gjennomsnittet for hud ligger rundt 0.2 (figur 14.b).

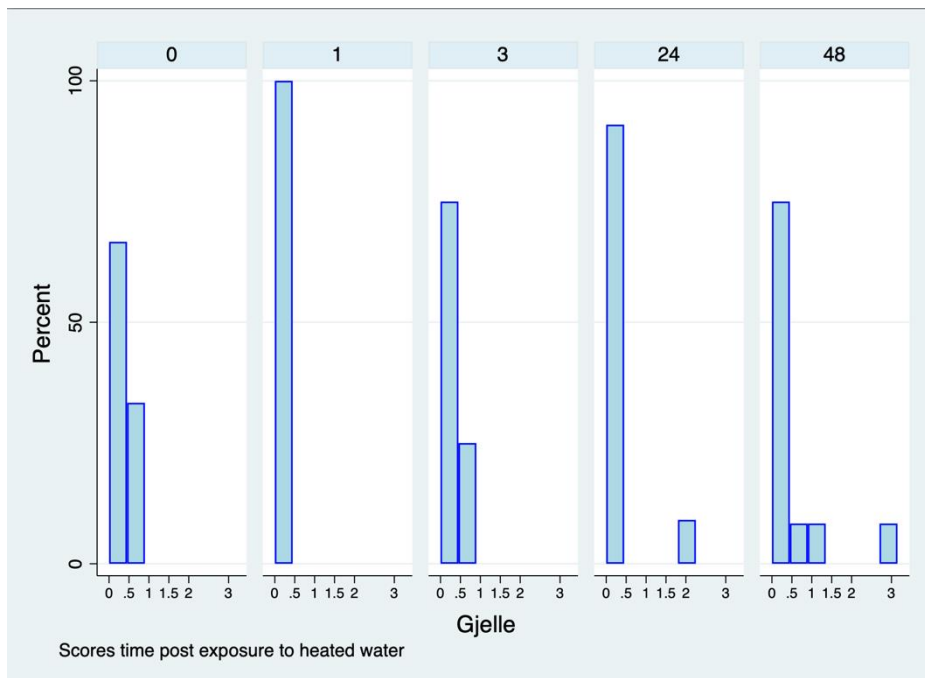


a)



b)

Figur 14. a) Resultater av scoring av hudlesjoner for de ulike uttakstidspunktene. Figuren viser at det er en tydelig overvekt av lave scoringer med verdi 0.0-0.6. Det kommer frem en svært liten spredning av resultatene i hver av tidsgruppene; b) Gjennomsnittlig score ved de ulike uttakstidspunktene i hud.



Figur 15. Resultater av scoring av gjellelesjoner i de ulike tidsgruppene. Det fremkommer at det var minimalt med patologiske forandringer i gjellesnittene. I tidsgruppene 24 og 48 timer etter eksponering forekom det et fåtall individer med større patologiske gjelleforandringer.

For å måle om det er en signifikant assosiasjon mellom scoren av patologiske forandringer på ytre overflater og tid, ble det utført en statistisk regresjonsanalyse. Resultatene fra analysen fra gjelle, finne og hud vises i tabell 6, 7 og 8.

Tabell 6: regresjonsanalyse finne. $P|t| > 0.05$.

. reg favg i.t

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	54
Model	.168676735	4	.042169184	F(4, 49)	=	0.43
Residual	4.80329444	49	.098026417	Prob > F	=	0.7861
				R-squared	=	0.0339
				Adj R-squared	=	-0.0449
Total	4.97197118	53	.093810777	Root MSE	=	.31309

favg	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
t						
1	.0995833	.1565459	0.64	0.528	-.2150073	.414174
3	.0008333	.1565459	0.01	0.996	-.3137573	.315424
24	-.0633333	.1565459	-0.40	0.688	-.377924	.2512573
48	-.0152778	.1565459	-0.10	0.923	-.3298684	.2993129
_cons	.4219444	.1278192	3.30	0.002	.1650822	.6788066

Tabell 7: regresjonsanalyse hud. $P|t| > 0.05$.

. reg havg i.t

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	54
Model	.160370373	4	.040092593	F(4, 49)	=	0.73
Residual	2.69666669	49	.055034014	Prob > F	=	0.5768
				R-squared	=	0.0561
				Adj R-squared	=	-0.0209
Total	2.85703707	53	.05390636	Root MSE	=	.23459

havg	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
t						
1	-.0833333	.1172966	-0.71	0.481	-.3190498	.1523831
3	-.0833333	.1172966	-0.71	0.481	-.3190498	.1523831
24	-.0666667	.1172966	-0.57	0.572	-.3023831	.1690498
48	.05	.1172966	0.43	0.672	-.1857164	.2857164
_cons	.2333333	.0957723	2.44	0.019	.0408717	.425795

Tabell 8: regresjonsanalyse gjelle. $P|t| > 0.05$.

. reg gj i.t

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	51
Model	.747942959	4	.18698574	F(4, 46)	=	0.65
Residual	13.2579394	46	.288216074	Prob > F	=	0.6306
				R-squared	=	0.0534
				Adj R-squared	=	-0.0289
Total	14.0058824	50	.280117647	Root MSE	=	.53686

gj	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
t					
1	-.21	.2772321	-0.76	0.453	-.7680392 .3480392
3	-.175	.2684288	-0.65	0.518	-.7153191 .3653191
24	-.1045455	.2724655	-0.38	0.703	-.6529902 .4438992
48	.1083333	.2684288	0.40	0.688	-.4319858 .6486525
_cons	.35	.2191712	1.60	0.117	-.0911687 .7911687

Resultatene fra regresjonsanalysen viser at det ikke er statistisk signifikant økning i score over tid for noen av organene som ble undersøkt ($P|t| > 0.05$). Noe av årsaken til dette er at 0-prøvene har en forholdsvis høy scoring, noe som gjør at man trenger en stor grad av forandring ved senere tidspunkt for å få frem en effekt av varmtvannsbehandlingen. Disse resultatene indikerer derfor at behandlingen av varmtvann ikke har en betydelig effekt på ytre overflater hos laksen.

Diskusjon

Adferdsendringer ved behandling

Det ble ikke utført systematisk vurdering av adferdsendringer hos fisken ved varmtvannsbehandling under dette forsøket. Det ble dog observert en endret atferd og tilsynelatende stressende individer under behandlingen. Disse observasjonene er forenelige med observasjonene beskrevet i den tidligere nevnte artikkelen «Siden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon» av Havforskningsinstituttet og Veterinærinstituttet. Slike observasjoner er ikke tilstrekkelige i seg selv til å konkludere med at fisken oppfatter smerte ved varmtvannsbehandlingen, men kan være en indikator. Videre forskning på dette området kan derfor være nyttig.

Behandlingsmetode

Det ble oppdaget under utførelsen av det første forsøket at det var utfordrende å holde fisken i varmtvannet i nøyaktig 30 sekunder. Under forsøk 1 ble det håvet én til tre fisk opp i karet av gangen, frem til det totalt var seks individer i varmtvannskaret samtidig. Tiden ble tatt fra og med det sjette individet var i det oppvarmede karet, noe som førte til at noen individer oppholdte seg i karet en god del lengre enn 30 sekunder. For å få mer nøyaktige resultater ble det ved andre forsøk kun håvet fisk én gang per behandling. På denne måten ble færre individer behandlet av gangen, men de ble behandlet like lenge og kun i 30 sekunder. Dette er årsaken til at det tok lengre tid å varmtvannsbehandle fiskene i forsøk 2.

Om dette påvirket resultatet vårt er vanskelig å konkludere med, men det fremkommer av figur 8 at det er en større spredning av graden av finneforandringer i forsøk 1 i forhold til forsøk 2. Det er mulig at dette skyldes variasjon i varigheten av varmtvannsbehandlingen, hvor de individene som oppholdt seg over lengre tid i det oppvarmede vannet fikk større finneforandringer. Et slikt funn vil i tilfelle kunne tyde på at varmt vann i seg selv kan gi forandringer på ytre overflater hvis fisken utsettes for det varme vannet over litt lengre tid. Slike funn vil være forenelige med funnene beskrevet av Gismervik et al. [33]. I denne artikkelen ble det funnet histopatologiske forandringer iblant annet gjeller ved varmtvannsbehandling av laks ved høyere temperaturer og over lengre tid enn det som er normal praksis i industrien i dag.

En annen mulighet for større spredning av graden av finneforandringer kan skyldes at vi behandlet flere individer samtidig i det første forsøket. Det ble konsekvent behandlet 6 individer samtidig i det første forsøket, mens det kun ble behandlet 2-4 individer av gangen i det andre forsøket, avhengig av hvor mange som ble håvet inn på ett forsøk. Et større antall individer i varmtvannskaret av gangen kunne tenke seg å gi økt grad av finneskade grunnet kollisjoner under panikkreaksjonene som ble observert. Man skulle da forventet en jevnt over større grad av finneskader i første forsøk, og ikke en større variasjon i graden av forandringer. Det er derfor mer trolig at det er variasjonen i varigheten av behandlingen som er årsaken til de ulike resultatene av finnescoren i de to forsøkene.

Effekt av anestesimiddel

Avliving av individene ble gjort ved å overføre fisken til et kar som inneholdt en overdose benzokain. Det ble ikke brukt en standardisert konsentrasjon eller mengde på de ulike forsøkene og på kontrollgruppen. Mengden anestetikum ble dosert etter effekt, hvor det var ønskelig at fisken døde innen 5 minutter etter at den ble satt i karet. Doseringen som ble brukt gjorde at

nærmest samtlige av fiskene oppnådde tap av likevekt i løpet ett minutt tid, og bevegelse av gjellelokk opphørte innen 2-3 minutter. Til tross for dette oppdaget vi 5-6 individer fordelt på de ulike tidsgruppene med en høyere toleranse for anestetikumet. Disse individene var i live i over 10 minutter etter at de var satt til i karet, og det ble vurdert til mest humannt å avlive disse med et hardt slag mot hodet. Dette var ikke vår fortrukne avlivningsmetode ettersom slag mot hodet kan gi akutte gjelleblødninger. Det kan derfor være en mulig feilkilde som kan ha gitt oss en feilaktig høy grad av patologiske forandringer i gjellene hos disse individene. Når resultatene fra scoringen av gjellesnittene blir studert (figur 13), sees det derimot at nærmest samtlige av gjellesnittene har svært lave scoringer, og dermed også svært liten grad av patologiske forandringer. Et lite antall individer med en feilaktig høy grad av patologiske forandringer i gjellene har derfor ikke påvirket sluttresultatet vårt i spesielt stor grad.

Variasjon i prøvetakingsprosedyre

Slik som nevnt under “metode og materiale” ble det tatt 10 vevsprøver fra hvert individ. Gjelleprøven ble tatt fra andre gjellebue på venstre side, uavhengig av eventuelle makroskopiske forandringer. Hudprøvene ble tatt fra standardiserte områder: skalletak, dorsalt 2 cm kranialt for ryggfinnen og dorsalt 2 cm kaudalt for ryggfinnen. I de tilfeller vi fant makroskopiske hudforandringer ble det mest kaudale hudsnittet byttet ut til fordel for et hudsnitt av det aktuelle, skadede området. Av hvert individ ble det også tatt 6 finneprøver fra hhv. ryggfinnen, gattfinnen, fettfinnen, halefinnen, samt prøve fra én av bukfinnene og én av brystfinnene. Det ble ikke laget en standardisert oppskrift på forhånd om prøvene skulle tas fra høyre eller venstre buk- og brystfinne. I de tilfeller vi fant makroskopiske finneforandringer valgte vi å ta ut disse til prøvetaking. Det er derfor mulig at finneprøvene som ble tatt for histologi hadde kroniske forandringer som følge av andre årsaker enn varmtvannsbehandling,

noe som kan gi falske forhøyde scoringer på enkelte prøver. Dette kan også ha bidratt til at flere i kontrollgruppen hadde høye scoringer.

Antall snitt per fisk

Det ble støpt inn 10 vevsprøver fra hvert individ; 1 gjellesnitt, 3 hudsnitt og 7 finneprøver. Ved mottagelse av de ferdige snittene kom det frem at flere av vevsprøvene manglet, fordi de var vanskelige å preparere histologisk. Som resultat av dette manglet det noen snitt fra flere individer. Dette gjaldt hovedsakelig snitt fra finneprøvene. Det manglet gjerne kun ett snitt per individ, noe som betyr at hvert individ hadde 8-10 vevsprøver som ble vurdert histologisk og scoret etter funn av patologiske forandringer. Dette mener vi er et tilstrekkelig antall for å få frem en eventuell trend, og det er lite sannsynlig at de manglende snittene hadde utgjort en stor forskjell på det endelige resultatet.

Begrensninger og generaliserbarhet

Begrensninger

Kontrollgruppen fikk en høy score jevnt over i alle organene som ble studert. Siden hvert enkelt snitt kun ble scoret en gang, er det en risiko for at de snittene som først ble studert, hadde blitt scoret annerledes etter at alle snittene hadde blitt scoret. Det er vanskelig å unngå at økt erfaring gjør at man kan score et snitt på en annen måte enn om man har mindre erfaring.

Det ble observert en stressrespons og fluktforsøk hos fisken under varmtvannsbehandlingen. Karet de ble behandlet i var gjennomsiktig, og det stod mennesker rundt karet under hele behandlingen. De hadde da også nettopp blitt håvet opp fra sitt opprinnelige kar til behandlingskaret. Det er derfor vanskelig å si om de fikk stressrespons som følge av

miljøforandringer og håndtering, eller om de reagerte på grunn av det varme vannet. Men ettersom vi ikke observerte den samme atferden når fiskene ble flyttet tilbake til avlivingskaret eller sitt opprinnelige kar som holdt 9°C, er det grunnlag for å tro at det oppvarmede vannet var årsaken til den observerte atferdsendringen.

Generaliserbarhet

Varmtvannsbehandling ute på anlegg i sjøen er utformet på en måte som gjør at fisken blir utsatt for mekanisk skade, høye støynivåer og stress ved for eksempel trengning. I denne studien har det kun blitt undersøkt om fisken får forandringer på ytre overflater ved eksponering for temperert vann. Selv om resultatet ikke ble signifikant, som tilsier at varmt vann ikke har en effekt på ytre overflater, kan en tenke seg at fisken blir påført forandringer på ytre overflater som følge av de andre faktorene nevnt ovenfor.

Fisken som ble brukt i dette forsøket har en lavere vekt enn fisken som blir behandlet med varmtvann ute på anlegg. Stor fisk påvirkes ikke i like stor grad av endringer i vanntemperatur, fordi at likevekten mot ytre vanntemperatur er forsinket. Siden eksponeringen for varmtvann er nokså kort, er det mulig at større fisk hadde fått enda mindre forandringer på ytre overflater enn fisken som ble brukt i dette forsøket.

Det ble utført et tilfeldig utvalg for å plukke ut individene som skulle med i forsøket. Fisken som ble brukt er forsøksfisk, som kun har bodd på forsøksanlegg. En kan tenke seg at et forsøksanlegg har optimaliserte forhold hva gjelder vannkvalitet og utforming av tanker/utstyr. På et oppdrettsanlegg i havet er det ikke alltid under like optimaliserte forhold, med høy tetthet, eventuelt slitt utstyr, og andre sykdomsagens. Fisken i havet kan derfor ha en enda mer svekket

hud- og slimbarriere i form av ytre overflater, enn fisk i forsøksanlegg. En kan derfor si at funnene i denne studien har gyldighet utover studiepopulasjonen.

Konklusjon

Termisk behandling er en mye omdiskutert behandlingsmetode, særlig på hvorvidt det medfører smerte og ubehag for fisken, og om det er en dyrevelferdsmessig forsvarlig behandling. I vår studie har vi forsøkt å studere hvilken effekt varmt vann har på fiskens ytre overflater, når man i størst mulig grad ekskluderer ytre faktorer som stress, trenging og mekaniske skader. I studien kommer det ikke frem at termisk behandling ved 28-34 grader i 30 sekunder medfører patologiske forandringer på hud, finner og gjeller hos atlantisk laks. Et slikt forsøk vil ikke gjenspeile situasjonen ved en standard termisk behandling, da fisken utsettes for flere faktorer som kan bidra til patologiske forandringer. Det ville derfor være logisk å forvente å finne tilstedeværelse av patologiske forandringer i hud, finne og gjeller hvis et liknende forsøk hadde blitt gjennomført ved bruk av Thermolicer eller Optilicer. Vi mener derfor at forsøket ikke er tilstrekkelig for å vurdere om varmtvannsbehandling av laks er dyrevelferdsmessig forsvarlig.

Takk til bidragsyttere

Veileder Øystein Evensen, som har hjulpet oss med alt fra å komme i gang med skrivingen, utførelse av forsøk og statistikken. Koestan Gadan, som var tilstede under forsøket, og som alltid stilte opp og var tilgjengelig. NIVA forsøksstasjon på Solbergstrand, for lån av utstyr og fisk til å utføre forsøket.

Summary

Title: Exposure of Atlantic salmon to warm water - effect on skin / external surfaces.

Authors: Ellingsen, Synne We, Moljord, Marianne

Supervisor: Evensen, Øystein, Institutt for basalfag og akvamedisin (BasAm)

Thermic delousing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is the most frequently used form of non-therapeutic treatments against the parasite *Lepeophtheirus salmonis*. Questions have been raised as to the acceptability of such treatment in terms of fish welfare, and what effect such treatment could have on external surfaces of fish. The purpose of this thesis was to explore if exposure to high water temperature results in morphologic changes of external surfaces of fish, including fin, gill and skin. The direct effect of temperature exposure itself is not known since treatment under field conditions include crowding and physical handling. We wanted to study the direct impact of high-water temperature by itself.

The experiment was performed as an experimental intervention study, where the individuals were exposed to water temperatures from 28 to 34°C for 30 seconds. Tissue samples from skin, gill and fins were sampled over a time period of 1-48 hours post exposure, and evaluated histologically by light microscopy. The results show no significant effect on the external surfaces from exposure to water temperatures ranging from 28 – 32 °C.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no

Referanser

1. *Sjømateksport for 99 milliarder i 2018*. [Internett] 2019 07.01.2019; Available from: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksport-for-99-milliarder-i-2018/>.
2. *Akvakultur*. [Internett] 2019; Available from: <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>.
3. Steinset, T.A. *Frå attåttnæring til milliardindustri*. [Internett] 2017; Available from: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/fracattatnaering-til-milliardindustri>.
4. Hjeltnes, B., et al., *Fiskehelse rapporten*, N.V. Institute, Editor. 2019, Norwegian Veterinary Institute: Oslo.
5. Gjerde, B., *Parasittiske arthropodar i veterinærmedisin*. Kompendium i veterinærmedisinsk parasittologi. Vol. 11. 2011, Oslo.
6. Hjeltnes, B., et al., *Fiskehelse rapporten 2018*. 2018, www.vetinst.no: Veterinærinstituttet 2019.
7. Hamre, L.A., et al., *The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) life cycle has only two Chalimus stages*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73539.
8. Nilsen, M., M. Neverlien, and L. Nøstbakken, *Behandlingsatferd knyttet til lakselus i norsk lakseoppdrett : en kvantitativ studie av et utvalg aktører i Nordland*. 2017, Norges Handelshøyskole: Bergen.
9. *Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg*. [Internett] 2012; Available from: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140>.
10. Andersen, K.Å., *Effekten av forskjellig saltholdighet på overlevelsen og adferden hos copepodittstadiet til *Caligus elongatus**, in *Institute of Biology*. 2006, University of Oslo. p. 54.
11. Aaen, S.M., *Chemotherapeutants against salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*: screening of efficacy*, in *Faculty of Veterinary Medicine*. 2016, Norwegian University of Life Sciences: Oslo.
12. Denholm, I., et al., *Analysis and management of resistance to chemotherapeutants in salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae)*. Pest Manag Sci, 2002. **58**(6): p. 528-36.
13. Helgesen, K.O., T.E. Horsberg, and A. Tarpai, *The surveillance programme for resistance to chemotherapeutants in salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in Norway 2018*. 2018, Norwegian Veterinary Institute: Oslo. p. 18.
14. Elliot, J.M., ed. *Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts*. Stress and fish, ed. A.D. Pickering. 1981, Academic Press.
15. Poppe, T., et al., *Termisk behandling av laks*. Norsk veterinærtidsskrift, 2018. **130**(3): p. 148-156.
16. *Thermolicer*. [Internett]; Available from: https://steinsvik.no/no/produkter/n/seaculture/fiskehelse/thermolicer?gclid=CjwKCAiA2fjjBRAjEiwAuewS_dzPB7tq5YTATQ9dA-RMkaWTm3pxSGWn7OhAvZICzYOWR13hCUpD9xoCSdgQAvD_BwE.
17. https://optimar.no/docs/default-source/product-sheets/optilicer.pdf?sfvrsn=7c105a5f_7.
18. Grøntvedt, R.N., et al., *Termisk avlusning av laksefisk - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt*. 2015, Norwegian Veterinary Institute: Oslo. p. 33.

19. Elliott, J.M. and J.A. Elliott, *Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus*: predicting the effects of climate change*. J Fish Biol, 2010. **77**(8): p. 1793-817.
20. Genten, F., E. Terwinghe, and A. Danguy, *Atlas of fish histology*. 2009, Enfield, N.H: Science Publishers.
21. Kvellestad, A., *Fiskeanatomi*. 2018, Institutt for basalfag og akvamedisin: Oslo.
22. *Skinhelse og sårproblemer*. [Internett]; Available from: <https://www.biomar.com/no/norway/arkiv/helse/helseutfordringer/hudhelse-og-sarproblemer/>.
23. Tørud, B. and T. Håstein, *Skin lesions in fish: causes and solutions*. Acta vet scand, 2008. **50**: p. S7.
24. Sveen, L.R., et al., *Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 3565.
25. Svendsen, Y.S. and J. Bøgwald, *Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida**. Fish Shellfish Immunol, 1997. **7**(5): p. 317-325.
26. Kryvi, H. and T. Poppe, *Fiskeanatomi*. 2016, Bergen: Fagbokforl.
27. *Lov om dyrevelferd*. [Internett] 2009; Available from: <https://lovdata.no/lov/2009-06-19-97>.
28. *Dyrevelferd*. [Internett] 2019; Available from: <https://www.animalia.no/no/Dyr/dyrevelferd/>.
29. Noble, C., et al., *Velferdsindikatorer for oppdrettslaks : hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd*. 2018, Nofima: Tromsø.
30. *Forskrift om drift av akvakulturanlegg*. [Internett] 2008; Available from: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>.
31. *Termisk avlusning: Fiskevelferd, forskning og avklaring fra Mattilsynet*. [Internett] 2019 15.10.2019; Available from: https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/termisk_avlusning_fiskevelferd_forskning_og_avklaring_fra_mattilsynet.34470.
32. Nilsson, J., et al., *Sudden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon*. Vet Animal Sci, 2019. **8**: p. 100076.
33. Gismervik, K., et al., *Thermal injuries in Atlantic salmon in a pilot laboratory trial*. Vet Animal Sci, 2019. **8**: p. 100081.
34. https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/hi_og_vi_forelopi_g_svar_termisk_til_mattilsynet_mars_2019.34469/binary/HI%20og%20VI%20Forelopig%20svar%20termisk%20til%20Mattilsynet%20mars%202019.

Vedlegg

