

Effekt av termisk avlusning på gjellehelse hos atlantisk laks (*Salmo salar*) holdt i nedkjølt ferskvann

Anna Nygård Johansen



Masteroppgave i fiskehelse

Institutt for Biovitenskap

UNIVERSITETET I BERGEN

Juni 2023

Forord

Denne mastergradsoppgaven i fiskehelse er utført ved Fiskesykdomsgruppen (FDRG) ved Biovitenskapelig institutt på Universitet i Bergen. Takk til FHF for finansiering av prosjektet (901514), «effekter av behandling mot lakselus, amøbegjellesykdom (AGD), og notrengjøring på gjellehelse hos laks i oppdrett».

Aller først en stor takk til min veileder, Are Nylund, som egentlig ikke skulle ha flere masterstudenter, men som likevel sa ja da jeg spurte. Jeg har visst lenge at Are var riktig for meg, og takket være han fikk jeg gjøre siste del av FHF-prosjekt 901514. Takk for gode, hyppige og ærlige tilbakemeldinger, tålmodigheten din og gode samtaler på det rotete kontoret ditt.

Videre vil jeg rette en takk til alle som har lagt inn mange timer arbeid og hatt tålmodighet med meg under feltarbeid og på laboratoriet (de som vet, de vet). Takk til Christiane Trösse som tok på seg opplæring og oppfølging av RNA-isolasjon og real time RT-PCR, og Erwan som renset og analyserte RNA for meg da jeg kontaminerte prøvene mine til det uforståelige. Til Heidrun Nylund som renset og analyserte gjelleprøvene mine og Lindsey Moore som ble med på datainnsamling i felt. Og takk til Even Bysveen Mjølnerød for hjelp med histologi, innspill, råd og skravling på sal.

Jeg må også takke venner og familie som har heiet, støttet og hatt troen på meg, ikke bare under masteroppgaven, men også under hele studiet. Venninne mine, Tina, Oda, Pernille, Karoline, Victoria. Noen nevnt, ingen glemt. Sist, men ikke minst, en stor takk til min kjære Magnus, som på tvers av landegrenser har gitt meg masse støtte, motivasjon og latterkramper. Det var også hans idé å finne en passende motivasjonsquote av en viss MMA-stjerne til å avslutte dette forordet:

«And I'd just like to say from the bottom of my heart, I'd like to take this chance to apologize...to absolutely nobody»

- Conor McGregor

Innholdsfortegnelse

Forord	2
Sammendrag	4
1. Introduksjon	5
1.1 Norsk lakseoppdrett.....	5
1.2 Lakselus (<i>Lepeoptheirus salmonis</i>).....	5
1.3 Gjellehelse.....	6
1.4 Behandling.....	7
1.4.1 Ferskvannsbehandling.....	8
1.4.2 Termisk behandling	9
1.5 Målsetting.....	10
2. Material og metode	11
2.1 Termiske behandling mot lakselus (<i>Lepeophtheirus salmonis</i>)	11
2.2 Real time RT-PCR.....	13
2.2.1 RNA-isolasjon	13
2.2.2 Real time RT-PCR.....	14
2.3 Histopatologi	16
2.4 Tetthet av mikroparasitter	18
2.4.2 Normalisert uttrykk (NE).....	18
2.4.3 NE-fold	19
2.4.4 Effektiviteten til assay.....	19
2.4.5 Statistikk	19
3. Resultat	20
3.1. Anlegg GB	20
3.1.2 Histologi	24
3.1.3 RT-PCR	25
3.2 Anlegg LB.....	31
3.2.3 RT-PCR	36
4. Diskusjon	47
5. Konklusjon og videre arbeid	54
Referanser	55

Sammendrag

Gjelleproblematikk er en stor utfordring i norsk lakseoppdrett, og årsakene er ofte multifaktorielle. En del av problematikken omfatter ivaretagelse av gjellehelsen under ulike mekaniske avlusningsmetoder. Termiske avlusninger er svært vanlige i dag, men har blitt kritisert for å være en kilde til nye helseproblemer for laksen. Forskning viser at fisk utsatt for termisk avlusning på 34 °C i 30 sekunder viser tegn til smerte og stress, og det kan ta opp til en uke før fisken går tilbake til normal spiseatferd. Ferskvannsbehandlinger er også mye brukt, både i behandling mot gjelleamøber og lakselus. Begge behandlingene krever trenging av fisken, pumping/suging inn i brønnbåt, og transport i rørsystemer. Håndteringen i seg selv er en stressende situasjon for laksen, og studier har pekt på en sammenheng mellom økt lengde på fisken og økt mengde epidermale blødinger og slagmerker.

Målet med denne studien var å kartlegge effekten av laks holdt i fire timer i kjølt ferskvann (6-6,5 °C) fulgt av termisk avlusning (28,28,5 °C) (Δ 22 °C) på gjellehelsen. Det ble gjennomført to storskala behandlinger av atlantisk laks (*Salmo salar*) i to kommersielle anlegg på Vestlandet. Gjellehelsen ble kartlagt før og etter behandling, samt hos fisk som døde under behandling. Fisken ble undersøkt for ytre hudskader, gjellescore på gjellebuende på venstre side, antall bevegelige stadier av lakselus, forandringer i bukhalen, og i tillegg ble det foretatt en histologisk gjellescore. Det ble også tatt prøver for RNA-isolering for real time RT-PCR-analyser med henblikk på detektering av tilstedeværelse av kjente laksepato gener. Dødelighet i forsøksmerd ble registrert i hele forsøksperioden. Resultatene viste at gjellehelsen ikke ble betydelig negativt påvirket og behandlingen hadde god effekt på lakselus, selv på sensommeren ved termisk avlusning på 28-28,5 °C. Histologisk var det få signifikante endringer før og etter behandling. Man fant imidlertid at det kan være hensiktsmessig å vurdere patogenbelastningen i fisken i forkant av behandlingen. Fisken fikk økt tetthet av PMCV etter siste behandling og utviklet etter hvert CMS.

1.Introduksjon

1.1 Norsk lakseoppdrett

Norsk lakseoppdrett har siden slutten av 1970-tallet og frem til i dag vokst seg til å bli Norges nest største eksportnæring (Gaasland, 2020). Tall fra Fiskeridirektoratet viser at Norge produserte 1,36 millioner tonn atlantisk laks (*Salmo salar*) i året, tilsvarende en verdi på 107 milliarder norske kroner (*Statistikk for Akvakultur - Publikasjon*, 2019). I tillegg til verdien av selve laksen, er det et stort verdipotensial i havbruket som produsent av arbeidsplasser, teknologi- og industriutvikling og forskning. Den norske regjeringen har et ønske om en femdobling av verdiskapningen frem mot året 2050 hvor den totale verdiskapningen av norsk havbruk vil være 550 milliarder kroner (Solberg et al., 2021). Tall fra Sintef viser at produksjon av laks og ørret vil utgjøre en stor del av verdiproduksjonen i scenarioet for 2050 (Olafsen et al., 2012). Veien til dette målet kan avhenge av hvorvidt problemer og kunnskap knyttet til fiskens helse og velferd, bioteknologiloven, norsk forvaltning, fôrproduksjon og markedskrefter for å nevne noe, løses og utvikles. Det forutsetter at man finner løsninger på problemer knyttet til sykdom og velferd, rømming og genetisk påvirkning, forurensing, fôrproduksjon og bruk av arealer (Abolofia & Wilen, 2017; Asche et al., 1999; Costello, 2006; Olafsen et al., 2012; Oldham et al., 2023a).

1.2 Lakselus (*Lepeoptheirus salmonis*)

Lakselus (*Lepeoptheirus salmonis*) utgjør et av de mest signifikante problemene i produksjon av atlantisk laks (*Salmo salar*) i norsk fiskeoppdrett (Guragain et al., 2021; E. M. Jensen et al., 2020a; Øvergård et al., 2018; Overton et al., 2019). Denne parasitten tilhører fylum arthropoda, subfylum crustacea, klasse hexanauplia, subklasse copepoda, orden siphonostomatoida og familie caligidae (Harðardóttir et al., 2021). Lakselusen er obligat parasittisk og har et naturlig tilholdssted i norske farvann. Parasitten er obligat halofil og vertsregisteret er begrenset til laksefisk (Harðardóttir et al., 2021). Lakselusens livssyklus består av åtte stadier hvor lusen varierer i mobilitet. De første tre stadiene er planktoniske stadier. I nauplius 1 og nauplius 2 er lusen helt frittlevende, men i copepoditt-stadiet søker den etter vert og lever parasittisk i de resterende fem stadiene. Når copepoditten har festet seg til verten, beiter den på fisken og skifter skall til de immobile stadiene chalimus 1, etterfulgt av chalimus 2. Deretter kommer de mobile stadiene preadult 1 og 2. Etter åttende skallskifte har lusen blitt en reproduktiv adult (Samsing et al., 2016). Livssyklusens utviklingshastighet er temperaturavhengig (Tucker et al., 2000) og

når en vert er infisert, kan det ved en sjøtemperatur på 11 °C ta 2,6 dager fra nyklekket larve til copepoditt-stadiet, stadiet hvor lusen har blitt parasittisk (Samsing et al., 2016; Tucker1 et al., n.d.). Fra fertilisering til adult lus tar det mellom 40 og 52 dager (Hamre et al., 2009). En befruktet lakselus kan gi opphav til 1000 naupiluslarver (Hamre et al., 2019).

Kostnadene og tap forårsaket av lakselusen tilsvarer fem milliarder norske kroner (Heggland et al., 2019). Storskalaoppdretten gir gode forhold for lakselusens vekst og spredning, sammenlignet med naturlige forhold og opptre som et reservoar for lusen (Costello, 2009; Olaussen & Liu, 2011; Oldham et al., 2023). Villaksens migrasjon gjennom fjordene på vei til oppvekstområdene gjør den utsatt for disse reservoarene (Stene et al., 2022). Laks som er affisert med lakselus kan ses med lesjoner i hud som følge av at lusen spiser slim, hud, blod og muskulatur (Hamre et al., 2019a; Øvergård et al., 2018). Selv moderate infestasjoner av lus kan føre til lesjoner i hud, osmoregulatoriske problemer, immunsuppresjon og stress (Hamre et al., 2009; Overton et al., 2019). Skadene kan gi grobunn for sekundære infeksjoner av opportunistiske virus og bakterier, samt andre parasitter (Abolofia et al., 2017; Costello, 2006). Summen av disse påkjenningene påvirker fiskehelse og velferd, slaktevekt, filet kvalitet, økonomi og næringens omdømme (Abolofia & Wilen, 2017; Asche et al., 1999; Torrissen et al., 2013).

1.3 Gjellehelse

Laksens gjeller består av fire gjellebuer, dekket av operculum (gjellelokket), hvorpå hver gjellebue bærer gjellelamellene (Wilson & Laurent, 2002). De fire gjellebuene på hver side er beskyttet av et gjellelokk, men vannet strømmer over for å hente ut oksygenet gjennom et motstrømsprinsipp (Wilson & Laurent, 2002). Gjellenes plassering kan gjøre dem utsatt for et stort antall agens og miljøfaktorer, som gjør at gjelleproblematikk ofte er multifaktorielt (Gunnarsson et al., 2017; Mitchell et al., 2012; Østevik, Stormoen, Evensen, et al., 2022). Gjellene er ikke bare et respiratorisk organ, de er også viktige for fiskens osmoregulering, ekskresjon av nitrogenholdig avfall og immunsystem (Hjeltnes et al., 2018; Nilsson et al., 2018.; Wilson & Laurent, 2002; Yu et al., 2020). Avhengig av alvorlighetsgrad, kan endret funksjon virke negativt på fiskens evne til å håndtere lave oksygennivåer, stress og fysisk aktivitet (Hjeltnes et al., 2018). Gjellehelse er et alvorlig problemområde og gjelleproblematikken kan knyttes opp mot patogener, miljøforhold og mekanisk stress (Østevik, Stormoen, Hellberg, et al., 2022). Gjellebakteriene som kan gå på laks i sjø omfatter blant annet,

Yersinia ruckeri, *Candidatus Branchiomonas cysticola* og *Candidatus Piscichlamydia salmonis* (Mitchell & Rodger, 2011; A. Nylund et al., 2008; Rodger et al., 2011). Parasittene som kan gå på gjellene er *Lepeoptheirus salmonis*, *Paranucleospora theridion*, *Ichthyobodo salamonis*, *Parvicapsula pseudobranchicola*, *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKX) og *Paramoeba perurans* (Freeman & Kristmundsson, n.d.; Isaksen, 2013; Mitchell & Rodger, 2011; A. Nylund et al., 2005, 2021; A. Nylund, Pistone, et al., 2018; Rodger et al., 2011). Innen virus kan man finne Salmonid alfavirus (SAV), Salmonid gjellepoxvirus (SGPV), Piscine orthoreovirus (PRVI), Piscine myokardittvirus (PMCV) og Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV) (Mitchell & Rodger, 2011; A. Nylund et al., 2008; Rodger et al., 2011; Svendsen et al., 2019a)

1.4 Behandling

Et landsomspennende overvåkningsprogram av lakselus ble innført i 2008 som et forebyggende tiltak mot lakselus. Norge ble delt inn i 13 produksjonssoner, hvor oppdretterne i hver sone kan koordinere og kommunisere behandling og tiltak. Det stilles krav til oppdretter om telling av lus én gang i uken, med påfølgende rapportering til Mattilsynet. Grensen for når det må behandles går ved 0,5 kjønnsmodne hunnlus i snitt per fisk (Oldham et al., 2023), og behandling må iverksettes innen 14 dager etter oppdagelse av grenseoverskridende gjennomsnitt. I uke 21-26 er lusegrensen 0,2 for de sørlige fylkene, mens Nordland, Troms og Finnmark har den samme lusegrensen i ukene 21 til 26 (Harðardóttir et al., 2021; E. M. Jensen et al., 2020). Fokuset på lusegrensen og trafikkløssystemet kan ses på som drivkrefter bak den intensive behandlingen og oppdretterne må gjennomføre hyppige behandlinger mot parasitten for å være innenfor regelverket, også når behandlingene i seg selv kan bidra til skade, sekundære infeksjoner, immunsuppresjon og stress (Stene et al., 2022).

Norsk oppdrett begynte med medikamentell behandling av lakselus allerede i 1974. Den gang brukte de organofosfor forbindelsen triklorfon (Horsberg et al., 1989), og det har siden denne gang kommet flere medikamentelle behandlinger på markedet. Mest brukt er neurotoxiner og skallskiftehemmere (kitinsyntesehemmere) (Harðardóttir et al., 2019; Horsberg et al., 1989) I perioden 2012 til 2015 var behandling med kjemoterapeutika dominerende i norsk oppdrett med >81% av alle behandlinger (Overton et al., 2019). Den intensive bruken av kjemoterapeutika har vært en drivkraft for at parasitten allerede på 1990-tallet utviklet resistens mot flere av midlene (E. M. Jensen et al., 2020). Lusens sensitivitet til medikamentell behandling har sunket, og har ført til en økning i bruk av rensefisk og mekanisk avlusning (E.

M. Jensen et al., 2020). Fordelene ved dette skiftet er at den ikke-medikamentelle behandlingen ikke bidrar til resistensutvikling, gir færre utslipp av forurensende midler til miljø og omgivelser, samt kan være med på å bedre næringens omdømme (Poppe et al., 2018).

1.4.1 Ferskvannsbehandling

Ferskvann som behandlingsmetode ble innført som et alternativ til de kostbare, kontroversielle eller mindre effektive lakselusbehandlinger. Prinsippet om å bruke kaldt ferskvann er ikke noe nytt. Salmonide arter, som sjørørret, har benyttet seg av muligheten til å søke opp i elver i et forsøk på å fjerne parasitter (Groner et al., 2019). Halttunen et al., så at sjørørreten oppholdt seg nærmere elven og reiste tidligere tilbake i år med høyt infeksjonspress av lakselus sammenlignet med år med lavt infeksjonspress (Halttunen et al., 2018). Behandling med ferskvann har også vært mye brukt som et mildere alternativ til hydrogenperoksid mot AGD (Hjeltnes et al., 2018). Bruk av ferskvannsbehandling mot lakselus gikk fra 275 i 2020 til 412 behandlinger i 2021 (Veterinærinstituttet, 2022). Forskingen er delt i konklusjonen om ferskvannets effekt på lakselus. Ved under 29 ‰ salinitet har man sett at lakselusen slapp taket og døde (Connors et al., 2008) og at frittsvømmende copepoditter ble kompromittert, uavhengig av deres tilknytning til en vert (Bricknell et al., 2006). Stone et al., (2002) fant at ferskvannsbehandling mot lakselus som vedvarte i tre timer ikke var tilstrekkelig for å forhindre utvikling eller drepe lakselusen, men så at fastsittende copepoditter ble redusert. Fiskens slimlag har blitt foreslått å være en kilde til salter for lusen og dermed kan øke tiden lusen kan tåle det hypoosmotiske miljøet (Finstad et al., 2000).

Ferskvannsbehandling kan også by på problemer med oksygenering, pH og akkumulering av metabolitter, da behandlingen foregår over lang tid (Powell et al., 2000, 2015). Overflatevannets kjemi i Norge er karakterisert som mykt vann, dvs. lav bufferkapasitet (Henriksen et al., n.d.) Den kjemiske sammensetningen i ferskvannet kan være utslagsgivende for effektiviteten av ferskvannsbehandlingen som følge av akkumulering av karbondioksid (CO₂), ammoniakk, ammonium og vannets bufferkapasitet (Powell et al., 2015). Akkumulering av CO₂ kan lede til lav pH (surt vann) som vil øke permeabiliteten til fiskens gjeller på grunn av lav mengde kalsium (Ca²⁺) i vannet (Evans et al., 2005). Den lave pH-en kan igjen føre til aluminiumpåslag på laksens gjeller som følge av korrosjon (Jagoe, 1988). Ved bruk av ferskvannsbehandling i brønnbåt er det viktig å opprettholde god vannkvalitet for å optimalisere fiskevelferden og behandlingseffektivitet.

Ferskvannsbehandlings påvirkning på gjellenes mikrobiota er mindre kjent. Mikrobiotaen på laksens gjeller i sjøfase antas å være tilpasset sjøen, og utgjør en kombinasjon av bakterier, virus, archaea, virus, eukaryote mikroorganismer, symbionter og opportunistiske patogener (Lokesh & Kiron, 2016). Gjellenes mikrobiota kan være en viktig faktor i fiskens kamp mot infeksjoner gjennom konkurranse og produksjon av sopp- og bakteriehemmende komponenter (Lowrey et al., 2015), og en forstyrrelse i denne symbiosen kan predisponere fisken til sykdom forårsaket av fremmede agens (Clinton et al., 2021). Hvordan fire timer i nedkjølt ferskvann påvirker gjellenes mikrobiota og dernest laksens gjellehelse må undersøkes videre.

1.4.2 Termisk behandling

I 2016 og 2017 dominerte termiske avlusninger (>74%), etterfulgt av mekaniske avlusninger (>40%) (Overton et al., 2019). De fleste mekaniske og termiske behandlinger foregår ved at fisken trenges sammen i merden, pumpes/suges inn i avlusningsenheten og utsettes for en variasjon av spyling, børsting og bad som kan ha ulike temperaturer (Nygaard et al., 2020). Bakgrunnen for bruk av varmt vann er at parasitter tåler høye temperaturer dårligere enn fisken, og vil ta opp varmen raskere enn fisken, for så å slippe taket eller løsne fra fiskens overflate (Østevik, Stormoen, Evensen, et al., 2022). De mest brukte termiske avlusningsmetodene er med Optilicer og Thermolicer (Overton et al., 2019). Optilicer fungerer ved at fisken transporteres gjennom et vannbad, hvorpå hver fisk får lik eksponeringstid og temperatur (Roth, 2016). I en rapport av Nofima tar de for seg effekten ved bruk av Optilicer. De skriver at temperatur bør vektlegges over eksponeringstid, og anbefaler 28 °C om våren og 34 °C om sensommeren. De konkluderer med at metoden er «hurtig og effektiv måte å avluse fisk, samtidig som den ivaretar fiskevelferd», men at den døde fisken kunne ses med lesjoner, kapp, slag og gjelleblødninger (Roth, 2016). Thermolicer fungerer på samme vis, men benytter et varmebad som utformet som et rør med vannlås som fisken pumpes gjennom (Nygaard et al., 2020; Grøntvedt et al., 2015). I tiltaksrapporten av Nygaard et al., har Mattilsynet presisert følgende om termisk avlusning «*Vi vil i perioden ikke slå ned på bruk av termisk avlusning så sant det foreligger gode risikovurderinger som tilsier at fisken er robust nok til å tåle påkjenningsene de utsettes for. Dette vil bl.a. si at fisken skal være frisk, at man reduserer totalbelastningen til et minimum, og at man avbryter behandlingen umiddelbart ved mistanke om at fisken ikke tåler påkjenningsene. Behandlinger med temperaturer over 34 °C skal ikke forekomme*».

Behandlingsmetoden som tas i bruk burde også vurderes på bakgrunn av effekten på ulike lusestadier. Behandling med Thermolicer på 34 °C har vært rapportert å fjerne 75-100 % av mobile lus, men hadde ingen signifikant effekt på fastsittende lus (Grøntvedt et al., 2015). Roth, (2016) fant at Optilicer fjernet 99 % av mobile lus ved 28 °C på våren, med trengte 33 °C for å oppnå samme effekt om sommeren. Selv om fisken kan tolerere høye temperaturer i korte perioder, ser man at velferden underveis og i ettertid av behandlingen kan påvirkes negativt (Grøntvedt et al., 2015; Østevik, Stormoen, Evensen, et al., 2022; Poppe et al., 2018). Temperaturer har tendens til å påvirke fiskens vekstfaktor, immunsystem og metabolisme (Nilsson et al., 2018). Ved økte temperaturer kan fisken reagere ved å øke oksygenopptaket og aktivitetsnivået, samt akklimatisering i påfølgende dager (Folkedal, Stien, et al., 2012). Fisken kan også plasseres seg dypere i merden i perioden etter behandling som følge av stress (Folkedal, Torgersen, et al., 2012). Behandlingen involverer temperaturer langt over det laksen kan møte på i sitt naturlige habitat (Poppe et al., 2018). Behandlingen kan gi skader som kan ha innvirkning på helse og funksjon. Det er i ettertid av termisk avlusning sett skader som gjelleblødninger, skjelltap, sår i hud og i lukteepitel i nesehulen, samt økt dødelighet (Gismervik et al., 2017; Hjeltnes et al., 2018; Poppe et al., 2018). I forkant av behandlingen sultes fisken for å minimere at ekskresjonsprodukter påvirker vannkvaliteten negativt. Den sultede fisken vil også tendere til å ha et lavere energinivå og oksygenforbruk enn den mette fisken, noe som kommer av at fisken bruker mindre oksygen for å holde metabolismen i gang (Folkedal, Stien, et al., 2012).

1.5 Målsetting

Målsetting med dette studiet var å klarlegge om termisk avlusning har negativ påvirkning på gjellehelsen til laks. Kan overføring av laks til kjølt ferskvann før termisk behandling redusere en eventuell negativ påvirkning på laksens gjellehelse og velferd.

Hypotese H_0 : *Nedkjøling av laks i ferskvann i 4 timer og påfølgende behandling med lavere maksimal temperatur ($\Delta 22$ °C), har ingen effekt på konsekvensene av termisk behandling.*

2. Material og metode

Denne masteroppgaven er en del av et større FHF-prosjekt (901514). Prosjektet hadde som mål å kartlegge «effekter av behandling mot lakselus, amøbe-gjellesykdom (AGD), og not-rengjøring på gjellehelse hos laks i oppdrett». Prosjektet ble avsluttet høsten 2022.

2.1 Termiske behandling mot lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*)

Innsamling av materiale i felt

I dette studiet er termisk behandling i to anlegg (anleggene GB og LB) fulgt ved prøvetaking av fisken før og etter behandling, samt prøvetaking av fisk som døde under behandling. Prøver av fisken før og etter behandling ble gjennomført ute på anlegget for å sikre best mulig kvalitet på materialet. Fisk som døde under behandling ble kjølt ned og transportert innen 24 timer til laboratoriet til Fiskesykdomsgruppen (FDRG) ved UiB hvor den ble prøvetatt. Det ble registrert sjøtemperatur ved tidspunktene for prøvetaking og i tillegg ble ytterligere temperaturdata og lakselus data fra anleggene hentet inn fra Barentswatch.

Antall bevegelige stadier av lakselus ble registrert hos alle individer, fulgt av registrering av eventuelle ytre skader (beiteskader etter lakselus, hudsår og andre ytre endringer) hos fisken. Det ble så foretatt en gjellescore av begge sider av gjellebuene på venstre side.

Etter de ytre registreringer ble det tatt vevsprøver av andre gjellebue på venstre side for histologi og real time RT-PCR-analyser. Etter prøvetaking av gjellene ble bukhulen og perikardialhulen åpnet, og eventuelle patologiske endringer registrert. Hjertet ble tatt ut for histologi (formalin) og real time RT-PCR-analyser (tørris), mens prøver av nyre ble kun tatt ut for RNA-analyser. Det ble ikke tatt ut prøver for histologi av fisken som døde under behandling. Vevsprøvene på formalin ble sendt til Veterinærinstituttet for innleiring i parafin, snitting, og farging (Hematoksilin-eosin). Vevsprøver tatt ut for real time RT-PCR ble transportert inn til laboratoriet (FDRG – UiB) på tørris og senere lagret på – 50 °C før ekstraksjon av RNA.

Anlegg GB

Anlegg GB er lokalisert i Hordaland i et område med fullt sjøvann (salinitet ca. 34 ‰). Fisken var satt ut i anlegget i uke 36 (september) 2021. Mekanisk behandling mot lakselus ble gjennomført to ganger i 2021 og 11 ganger i 2022. I dette studiet ble behandling som ble gjennomført i uke 23 (juni 2022) fulgt (Tabell 2.1). Fisken hadde i 2022 tidligere vært behandlet mot lakselus i ukene 1, 5, og 16 (mekanisk fjerning av lakselus). Temperatur i sjø ved termisk behandling i uke 23 var 9,1 °C og ved uttaket 11 dager etter behandlingen var sjøtemperaturen 12,1 °C.

Tabell 2.1. Uttak av vev for histologi og real time RT-PCR (qPCR) i anlegg GB.

Dato	N	Gj. Histo.	Gj. qPCR	Hj. qPCR	Nyre qPCR
08.06.2022	30	+	+	+	+
09.06.2022	30	-	+	+	+
20.06.2022	32	+	+	+	+

Den termiske behandling ble gjennomført etter at fisken hadde vært holdt i kjølt (6,5 °C) ferskvann i fire timer. Temperaturen ved termisk behandling var 28,5 °C ($\Delta = 22$ °C) og behandlingstiden var 30 sekunder. Fisken ble pumpet fra merden, inn i brønnbåten, hvor den ble holdt i nedkjølt ferskvann. Den ble så overført til et nytt kammer hvor den gjennomgikk termisk behandling. Etter behandling ble fisken pumpet ut i merden. Prevalens og tetthet av microparasitter i gjeller og nyren ble undersøkt ved hjelp av real time RT-PCR.

Anlegg LB

Anlegg LB er lokalisert i Hordaland i et område med fullt sjøvann (salinitet ca. 34 ‰). Laksen hadde tidligere vært lokalisert i anlegg GB, men ble flyttet til LB i løpet av sommeren 2022. Fisken hadde vært gjennom en mekanisk avlusing i uke 28 (juli) før termisk behandling i uke 34 (august 2022). Laks ble tatt ut før behandlingen, 24.08.2022, og i tillegg ble det tatt ut fisk 14 dager etter behandling og fisk som døde under behandlingen (Tabell 2.2). Temperatur i sjø ved termisk behandling i uke 34 var 15,8 °C og ved uttaket 14 dager etter behandlingen var sjøtemperaturen 15,3 °C.

Tabell 2.2. Uttak av vev for histologi og real time rT PCR (qPCR) i anlegg LB.

Dato	N	Gj. Histo.	Gj. qPCR	Hj. qPCR	Nyre qPCR
-------------	----------	-------------------	-----------------	-----------------	------------------

24.08.2022	30	+	+	+	+
26.08.2022	30	-	+	+	+
08.09.2022	31	+	+	+	+

Den termiske behandling ble gjennomført etter at fisken hadde vært holdt i kjølt (6,0 °C) ferskvann i fire timer. Temperaturen ved termisk behandling var 28,0 °C ($\Delta = 22$ °C) og behandlingstiden var 30 sekunder. Fisken ble pumpet fra merden, inn i brønnbåten, hvor den ble holdt i nedkjølt ferskvann. Den ble så overført til et nytt kammer hvor den gjennomgikk termisk behandling. Etter behandling ble fisken pumpet ut i merden. Prevalens og tetthet av microparasitter i gjeller og nyren ble undersøkt ved hjelp av real time RT-PCR. I tillegg ble hjertevev fra død fisk undersøkt for utvalgte virus (PRV1, PMCV, SAV og IPNV) og *Paranucleospora theridion*.

2.2 Real time RT-PCR

2.2.1 RNA-isolasjon

RNA fra gjeller og nyre ble isolert ved bruk av «TRIzol® Reagent (Life Technologies)» for videre real time RT PCR-analyse. Anbefalt protokoll fra ThermoFisher, med noen modifikasjoner, ble benyttet for å gjennomføre isoleringen.

Alle prøverørene ble tilsatt 1000 µl TRIzol, inkludert røret for negativ kontroll. Det ble tilsatt stålkuler til nyreprøvene i forkant av homogeniseringen. Homogeniseringen av prøvene ble foretatt i TissueLyser II Qiagen, hvor prøvene ble ristet i tre minutter, med tretti vendinger per sekund. Prøvene ble så spunnet ned i avtrekksskap og inkubert i fem minutter ved romtemperatur. Videre ble det tilsatt 200 µl kloroform, etterfulgt av femten sekunder manuell risting og fem minutter inkubasjon i romtemperatur. I neste steg ble det opprettet fase-separasjon via sentrifugering i Thermo Scientific Heraeus Fresco i femten minutter på 12 000 X G i 4 °C. I neste steg ble 350 µl av vannfasen ekstrahert fra prøven og overført til et nytt rør tilsatt 500 µl Isopropanol og inkubert i ti minutter i romtemperatur for utfelling av RNA. RNA-fasen ble så komprimert til en pellet gjennom sentrifugering i femten minutter på 12 000 X G i 4 °C. Supernatanten ble så kastet og pelleten ble vasket med 75% 1000 µl etanol, etterfulgt av noen sekunder i Vortex V-Plus (Biosan). Prøven med pelleten ble så sentrifugert i fem minutter på 12 000 X G i 4 °C før den ble vasket med 100% 1000 µl etanol og vortexet. Etter en siste sentrifugering ble supernatanten kastet og tuben med pelleten ble lagt til tørk i 10-15 minutter

(fordamping av etanol). Deretter ble det tilsatt 150 μL MilliQ RNA-fritt vann som holdt en temperatur på 70 °C. Konsentrasjonen og renheten på RNA-isolatene ble kontrollert ved bruk av spektrofotometer (NanoDrop). Spektrofotometeret måler RNA-konsentrasjonen ved 260 nm og ved 280 nm måles renheten til prøven. Deretter ble prøvene lagret ved -25 °C forut for real-time RT-PCR-analyse.

2.2.2 Real time RT-PCR

Real-Time RT-PCR er metoden som ble benyttet for å effektivt identifisere RNA fra bestemte mikroparasitter. Ekstrahert og isolert RNA fra gjeller og nyrer ble analysert ved bruk av AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit (ThermoFisher Scientific) og Applied Biosystems QuantStudioTM Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Kitet muliggjør å kjøre både revers transkripsjon og PCR-reaksjonen i samme røret. For å gjennomføre Real-Time RT-PCR tilsetter man en mastermix bestående av spesifikke prober og primere, samt templat, til et brønnbrett (Applied Biosystems MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate). QuantStudio registrerer amplifikasjonen av templatet samtidig som reaksjonen foregår og forteller hvor mye av templatet som er til stede i prøven. Mekanismen som muliggjør dette, er bruken av et fluorescerende molekyl som proben frigjør når den binder bestemte sekvenser. Fluorescenssignalet øker med mengden replikert cDNA og kan observeres av QuantStudio, dermed kan mengden måltemplat kvantifiseres. Gjennom flere sykluser amplifiseres prøvene til cDNA, og jo raskere de når terskelverdien på 0.1, desto mer templat er det i prøvene. Måleenheten for hvor raskt en prøve krysser terskelverdien, kalles Ct-verdi. En lav Ct-verdi indikerer mye måltemplat og vice versa.

Mastermixen består av 2X RT-PCR Buffer (Applied Biosystems), forward primer (F primer), revers primer (R primer), probe (TaqMan), 25X RT-PCR enzym (Ambion) og RNase-fritt vann (Sigma-Aldrich) (tabell 2.3). I tillegg til mastermix, tilsettes 2.0 μL templat til brønnene. De to ytterste kolonnene bestod av negativ rense-kontroll (RK) og non-template kontroll (NTC) for hvert assay.

Tabell 2.3. Komponentene i mastermixen, assosiert med volumet (μL) for assayene. Volumet tilsvarer med mengde for å kjøre én analyse for hvert assay. Konsentrasjonen for F primer, R primer og probe er skrevet i parentes.

Komponent	Ordinær	Pperu	POX MCP
2X RT-PCR Buffer	6.25	6.25	6.25
F primer	1.0 (800 nM)	1.0 (800 nM)	0.5 (800 nM)
R primer	1.0 (800 nM)	1.0 (800 nM)	0.5 (800 nM)
Probe	0.22 (175 nM)	0.28 (175 nM)	0.28 (175 nM)
25X RT-PCR enzym	0.25	0.25	0.25
RNase-fritt vann	1.78	1.72	1.72
RNA-templat	2	2	2
Totalt volum	12.5	12.5	12.5

Reaksjonen begynner med revers transkripsjon på 45° C i 10 minutter. Deretter øker temperaturen til 95 °C. Dette steget deaktiverer revers transkriptase og aktiverer DNA-polymerasen. I siste steg amplifiseres måltemplat gjennom 45 sykluser. De 45 syklusene består av to steg, 45 sekunder på 95 °C for dissosiering av DNAet, etterfulgt av 15 sekunder på 60 °C for å oppnå binding av primere og elongering.

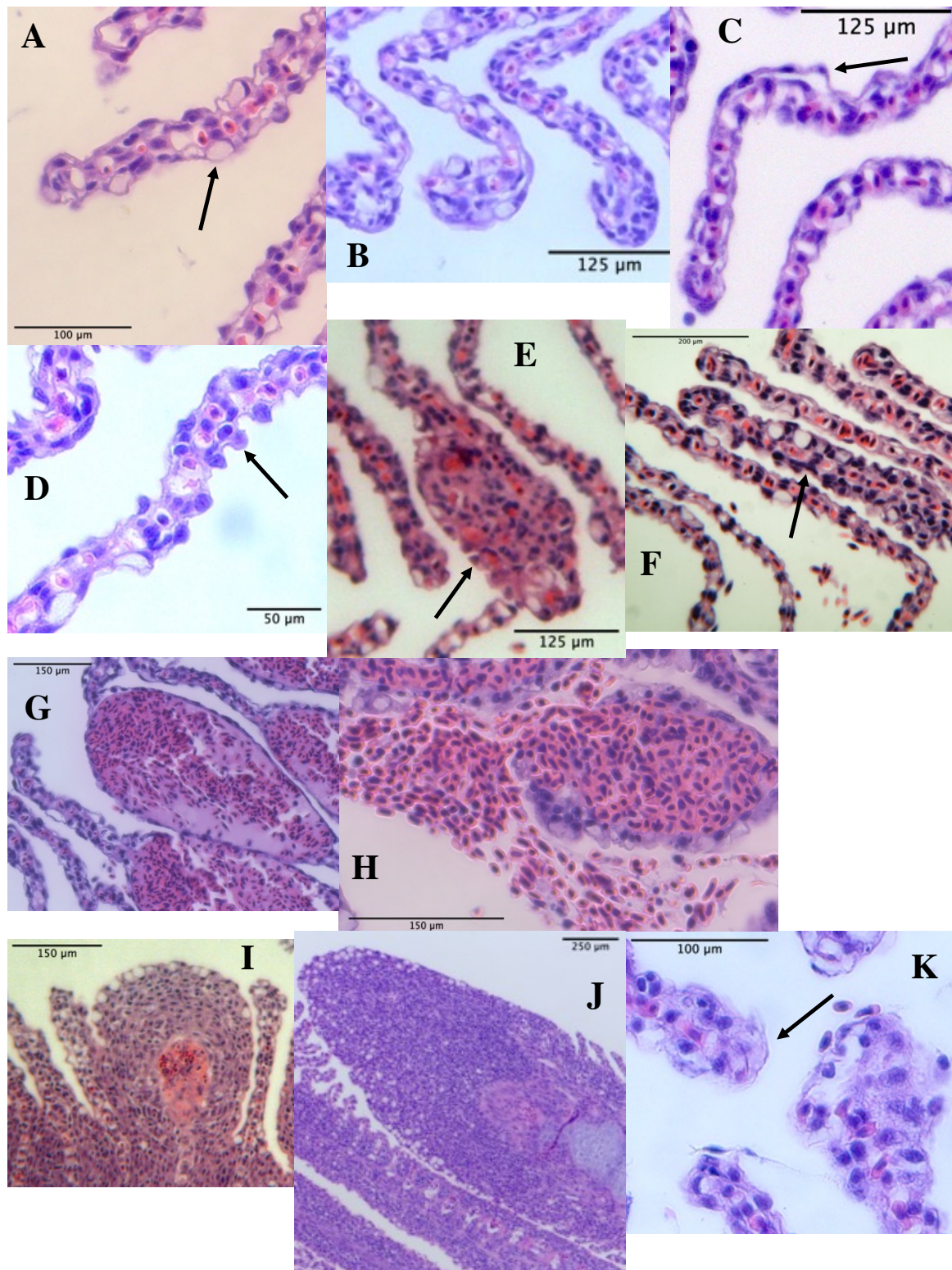
Tabell 2.4. Primere og TaqMan prober til assays for mikroparasitter og elongeringsfaktor fra laks (ELA) brukt i Real-Time RT-PCR. Effektiviteten er beskrevet i referanser.

Assay	Primer	Sekvens	Referanse
Infeksiøs lakseanemivirus (Segment 7) (ISAV)	Probe	CAC ATG ACC CCT CGT C	(Plarre et al., 2005)
	Forward	TGG GAT CAT GTG TTT CCT GCT A	
	Reverse	GAA AAT CCA TGT TCT CAG ATG CAA	
Salmonid alfavirus (nsP1) (SAV)	Probe	CTG GCC ACC ACT TCG A	(Hodneland & Endresen, 2006)
	Forward	CCG GCC CTG AAC CAG TT	
	Reverse	GTA GCC AAG TGG GAG AAA GCT	
Bakteriell nyresyke (BKD)	Probe	TGC AGA AAT GTA CTC CC	A. Nylund, pers. kom.
	Forward	CAA GGC TTG ACA TGG ATT AGA AAA	
	Reverse	CAC CTG TGA ACC AAC CCA AAA	
Piscine orthoreovirus 1 (PRV1-M2)	Probe	CTG GCT CAA CTC TC	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	CAA TCG CAA GGT CTG ATG CA	
	Reverse	GGG TTC TGT GCT GGA GAT GAG	
Piscine orthoreovirus 3 (PRV3-S1)	Probe	CGA AGY ATA ATG AAG A	A. Nylund, pers. kom.
	Forward	GCG ACG CCT TAG AGA CAA CA	
	Reverse	CRA GAT CAC CAG TGG TCT TT	
Salmonid gjellepoxvirus (POX MCP) (SGPV)	Probe	TTA TAC ACC ATC ACA TTT GTG	(A. Nylund et al., 2021)
	Forward	CAG AGG TTT TTC ATA CGC CAG AA	
	Reverse	GAG GTC ACG GTG ATG ACA GAA C	
Piscine myokardittvirus (PMCV)	Probe	TGG TGG AGC GTT CAA	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	AGG GAA CAG GAG GAA GCA GAA	
	Reverse	CGT AAT CCG ACA TCA TTT TGT GA	
Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV)	Probe	TCT TGG CCC CGT TCA TT	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	ACC CCA GGG TCT CCA GTC	
	Reverse	GGA TGG GAG GTC GAT CTC GTA	

<i>Candidatus</i> <i>Branchiomonas cysticola</i> (Epit)	Probe	ACT TAG CGA AAG TTA AGC	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	GAG TAA TAC ATC GGA ACG TGT CTA	
	Reverse	GTG CTT TCC TCT CCC AAG CTT ATG C	
<i>Paranucleospora theridion</i> (Nuc)	Probe	TTG GCG AAG AAT GAA A	(S. Nylund et al., 2010)
	Forward	CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG GGT	
	Reverse	CCA GGT TGG GTC TTG AG	
<i>Paramoeba perurans</i> (Pperu)	Probe	CTG GTT CTT TCG RGA GC	(A. Nylund, Pistone, et al., 2018)
	Forward	GAT AAC CGT GGT AAA TCT AGA GCT	
	Reverse	AAT A TGG CAT TGG CTT TTG AAT CT	
<i>Ichthyobodo</i> spp. (Costia)	Probe	TCC ACG ACT GCA AAC GAT GAC G ACG	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	AAC TTA TGC GAA GGC A TGA GTA TTC	
	Reverse	ACT YCC GAT CCA T	
<i>Parvicapsula pseudobranchicola</i> (Parvi)	Probe	CCG TAT TGC TGT CTT TGA	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	TCG TAG TCG GAT GAC AAG AAC GT	
	Reverse	AAA CAC CCC GCA CTG CAT	
Atlantisk laks elongeringsfaktor (ELA)	Probe	TC GGT GGT ATT GGA AC	(Olsvik et al., 2020)
	Forward	CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA CAC	
	Reverse	ACG GCC CAC AGG TAC A	
X-celle-liknende parasitt (PER)	Probe	AGC GTT GAG CGG AT	A. Nylund, per. kom.
	Forward	CCC TGC TAA ATA GTA TGC GGT ATA CA	
	Reverse	ACC TTC AAA ATA AGA ACA ATC AGC AA	
<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i> (PKX)	Probe	TGT TGT TAG GAT ATT TTC C CAA GAT	(Freeman & Kristmundsson, n.d.)
	Forward	CGC GCC CTA TCA AT CGT CAC CCG TTA	
	Reverse	CAA CCT TGT	
<i>Candidatus</i> <i>Piscichlamydia salmonis</i> (Pch)	Probe	CAA AAC TGC TAG ACT AGA GT	(A. Nylund, Hansen, et al., 2018)
	Forward	TCA CCC CCA GGC TGC TT	
	Reverse	GAA TTC CAT TTC CCC CTC TTG	
<i>Yersinia ruckeri</i>	Probe	TAA TAG CAC TGA ACA TTG AC	(Keeling et al., 2012)
	Forward	GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG	
	Reverse	CGG TGC TTC TTC TGC GAG TAA	
<i>Tenacibaculum</i> spp. (Tb-tuf)	Probe	TTT CAA TAC ATA CAC CTC AGC	(FrischI et al., 2018)
	Forward	AGT GTG ACG TCC ACC TT	
	Reverse	CTG TAA GCC AGG TTC TGT	
<i>Candidatus</i> <i>Syngnamydia salmonis</i> (SCh)	Probe	TCC TTC GGG ACC TTA C	(S. Nylund et al., 2015)
	Forward	GGG TAG CCC GAT ATC TTC AAA GT CCC	
	Reverse	ATG AGC CGC TCT CTC T	

2.3 Histopatologi

For analyse og detektering av histologiske endringer (histopatologi) ble parafinsnitt fra gjellevev benyttet. Prøvene av 2. gjellebue ble sendt til Veterinærinstituttet i Bergen for prosessering. Gjellevevet ble snittet sagittalt i 2 µm tykke snitt og montert på objektglass belagt med poly-L-lysin (SuperfrostPlus, Thermo Scientific, Germandy) for bruk i mikroskopi. Vevsnittene ble farget med hematoksylin og eosin (HE) etter standardprosedyre. Histologisnittene ble deretter sendt til UiB for videre analyse ved mikroskopi.



Figur 2.1. Histologi som viser de elleve patologiske endringene som inngår i scoringssystemet for gjeller brukt i dette studiet. **A:** slimcellehyperplasi, **B:** klubbing, **C:** lifting, **D:** epitelcellehypertrofi, **E:** epitelcellehyperplasi, **F:** fortykket distal primærlamelle, **G:** fersk aneurisme, **H:** blødende aneurisme, **I:** gammel aneurisme, **J:** inflammasjon, **K:** nekrose. Pil viser de ulike endringene. Forstørrelse kan ses på hvert bilde.

Den histologiske scoringen av gjellene tok utgangspunkt i fem primærlameller på hvert snitt. Analysen av gjellene hadde som formål å se på endringer i vev og celler som avviker fra normalhistologien til gjellene. Systemet for gjellescoringen er utviklet av Alf. S. Dalum (Pharmaq Analytiq) i forbindelse med FHF-prosjektet. Systemet er basert på elleve typiske patologiske endringer man kan finne i gjellevev, hvor hver av disse fikk en score mellom 0 og 3. En score 0 ble beregnet på vev hvor man fant ingen/veldig få endringer. Score 1 ble gitt for histologi som viste milde endringer, score 2 for moderate endringer og ved score 3 var det omfattende endringer. Scoringen ble gjort på bakgrunn av prosentvis forekomst i vevet, foruten to parametere. Ved under 10 % affektert vev for hver enkelt parameter, tilsvarte det en score 1 ($\leq 10\%$). Mellom 10% og 50 % var en score 2, hvorpå en score 3 tilsvarte endringer i over 50 % ($> 50\%$) av gjellevevet. De to parameterne som ikke fulgte ordinær prosentscoring var slimcellehyperplasi (A) og fortykket distal primærlamelle (F). Slimcellehypertrofi ble beregnet på bakgrunn av antall slimceller på hver sekundære lamelle. Opp til 3 var score 1, 4 til 8 var score 2 og over 8 var en score 3. Scoring for fortykket distal primærlamelle tok utgangspunkt i alle gjellebuens primærlameller. Dersom 10 % av primærlamellene var påvirket var det en score 1, mellom 10 og 50 % var score 2 og hvis over 50 % av primærlamellene var affektert, tilsvarte det score 3.

2.4 Tetthet av mikroparasitter

Tetthet er et mål på hvor mange RNA kopier fra et spesifikt patogen som er til stede i vevsprøven. Tetthet i denne studien måles i normalisert uttrykk (NE) av RNA.

2.4.2 Normalisert uttrykk (NE)

For å regne ut normalisert uttrykk er det tatt utgangspunkt i referansegenet elongeringsfaktor alfa fra atlantisk laks (*Salmo salar*). Formelen for å regne ut normalisert uttrykk er (1): E_{ref} = effektiviteten til elongeringsfaktoren (ELA), Ct_{ref} = Ct-verdien til elongeringsfaktoren (ELA), $E_{mål}$ = effektiviteten til målpatogenet, og $Ct_{mål}$ = målpatogenets Ct-verdi.

$$(1) NE_{gjellevev} = \frac{(E_{ref})^{Ct_{ref}}}{(E_{mål})^{Ct_{mål}}}$$

2.4.3 NE-fold

Prøvene ble gjennom formel (2) regnet om til NE-fold. NE-fold får man ved å dele det normaliserte uttrykket fra (1) på den den laveste NE-verdien (NE_{\min}) i datasettet.

$$(2) NE_{fold} = \frac{NE}{(NE_{\min})}$$

NE-fold gir en stor variasjonene mellom prøvene. Ved å \log_2 -transformer dataene illustrerer man bedre variasjonen mellom mengden patogen i prøvene.

2.4.4 Effektiviteten til assay

Tabell 2.5. Agens og effektiviteten til gitte agens` (målpatogen) assays, brukt til å regne ut NE og NE-fold.

Agens	Effektiviteten til målpatogen
Atlantisk laks elongeringsfaktor (ELA)	1,987
Salmon gill pox virus (SGPV)	1,968
Piscine myokardittvirus (PMCV)	2,0958
Infeksiøs lakseanemi (ISAV)	1,9461
<i>Piscine orthoreovirus</i> (PRV1)	1,95
<i>Parvicapsula pseudobranchicola</i> (Parvi)	1,972
<i>Candidatus Branchiomonas cysticola</i> (Epi)	1,9819
<i>Candidatus Piscichlamydia salmonis</i> (Pch)	2,001
<i>Yersinia ruckeri</i>	1,988
<i>Ichthyobodo spp.</i> (Costia)	1,92
<i>Paranucleospora theridion</i> (Nuc)	1,9697
Salmonid alfavirus (nsP1) (SAV)	1,985

2.4.5 Statistikk

For å analysere endringer i tetthet av patogener ble NE-fold fra positive individer benyttet for statistisk analyse. For å utføre den statistiske analysen, samt lage grafene, ble GraphPad Prism 9 for macOS, versjon 9.5.1 brukt. P-verdiene brukt i resultatet er * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, **** = $P \leq 0.0001$, og ***** = $P \leq 0.0001$.

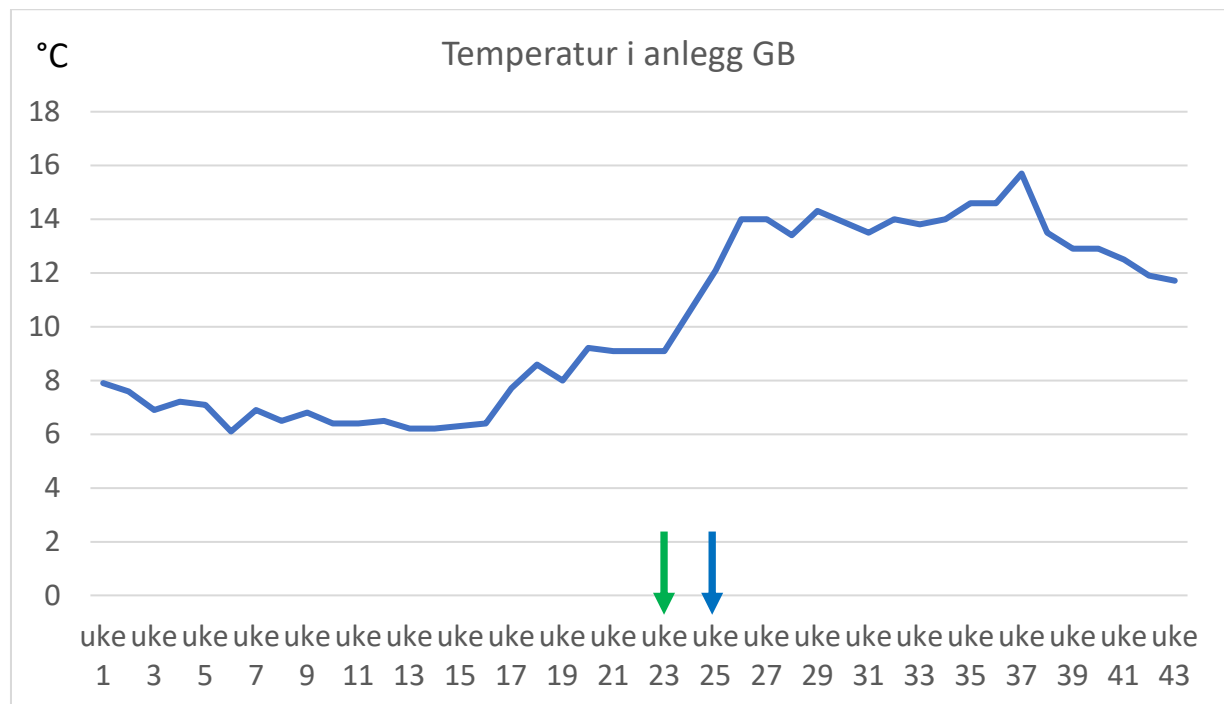
3. Resultat

To termiske behandlinger av laks holdt i fire timer i kjølt ferskvann er fulgt og forekomst av mikroparasitter før og etter behandling er registrert. I tillegg er forekomsten av de samme patogener hos fisk som døde under behandlingen kartlagt. Gjellehelsen er kartlagt ved makroskopisk gjellescore av laks før og etter behandling og i tillegg det foretatt en histologisk gjellescore basert på snitt av gjellevev.

3.1. Anlegg GB

3.1.1 Abiotiske faktorer

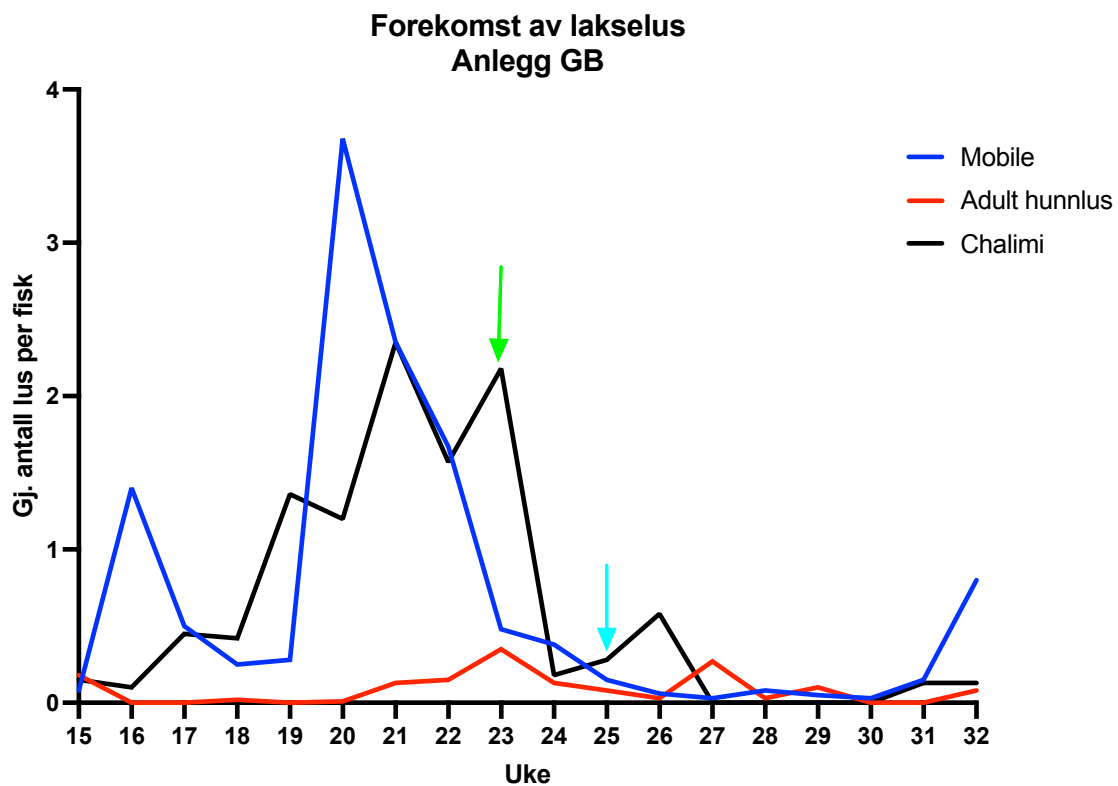
Sjøtemperatur i forkant, under og etter termisk behandling av laks på lokalitet GB (figur 3.1).



Figur 3.1: Oversikt over temperatur i sjø i anlegget GB i forkant av behandling, under behandling og etter behandling. Uttak av laks før behandling (grønn pil) uttak av laks etter behandling (blå pil). Data hentet fra BarentsWatch.

Den gjennomsnittlige temperaturen i ukene før behandling (uke 15-22) var 8 °C. Temperaturen i sjøen på behandlingsdagen var 9,1 °C. Lakselus ble registrert på fisken før og etter behandling (og hos død fisk) og i tillegg er det hentet inn lakselusdata fra BarentsWatch (figur 3.2). Telling av bevegelige stadier av lakselus 8.juni 2022 (før behandling) gav en gjennomsnittlig verdi på 2,8 lus/fisk, mens det gjennomsnittlige antall lus hos død fisk (etter behandling) var 0,8 lus/fisk.

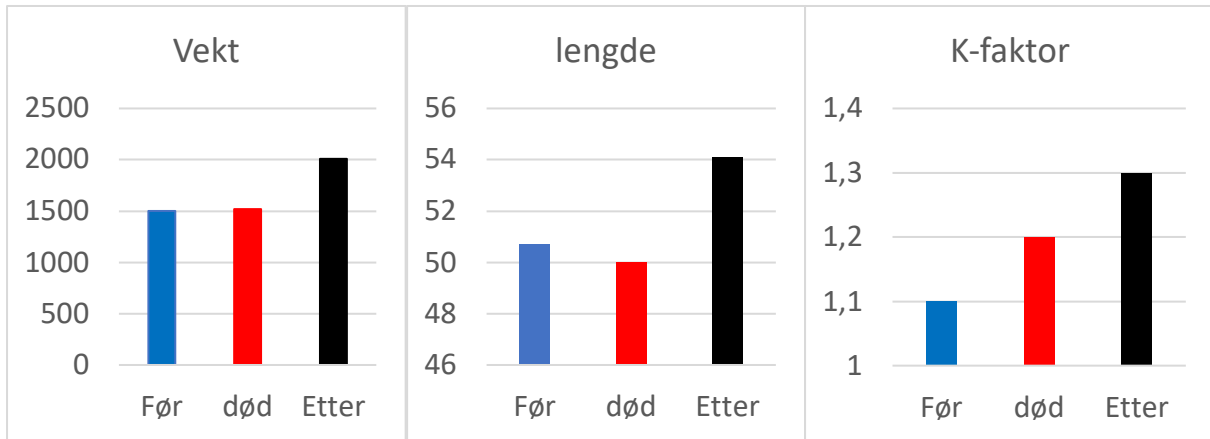
I uttaket 11 dager etter behandling ble det registrert 1,0 lus/fisk. Høyeste telte antall på én fisk i siste prøvuttak var åtte lus.



Figur 3.2: Antall lakselus før, under og etter termisk behandling. Uttak av laks før behandling (grønn pil) uttak av laks etter behandling (blå pil). Data hentet fra BarentsWatch.

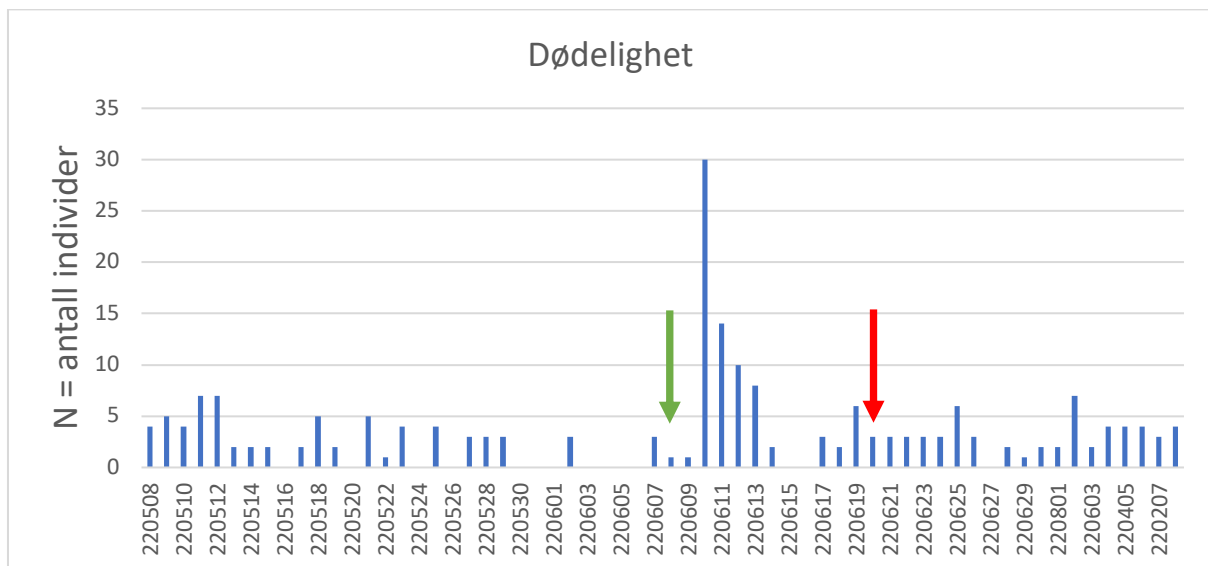
Makroskopisk gjellescore ble gjennomført før og etter termisk behandling. Begge sidene av gjellebuene på venstre side ble inkludert i evaluering av den makroskopiske gjellehelsen (Figur 3.2). Før behandling ble det observert gjellescore på 14 av 30 (46,7 %) laks hvor maksimal score på en gjelleside var 2. 11 dager etter behandling ble det observert gjellescore på 14 av 32 (43,8 %) undersøkte individer. Også her var maksimal score 2 på en gjelleflate.

Den gjennomsnittlige vekt, lengde og kondisjonsfaktor før og etter behandling samt hos fisk som døde under behandling kommer frem av figur 3.3.



Figur 3.3. Vekt, lengde og kondisjonsfaktor hos laks i anlegg GB før og etter termisk behandling, samt hos død fisk.

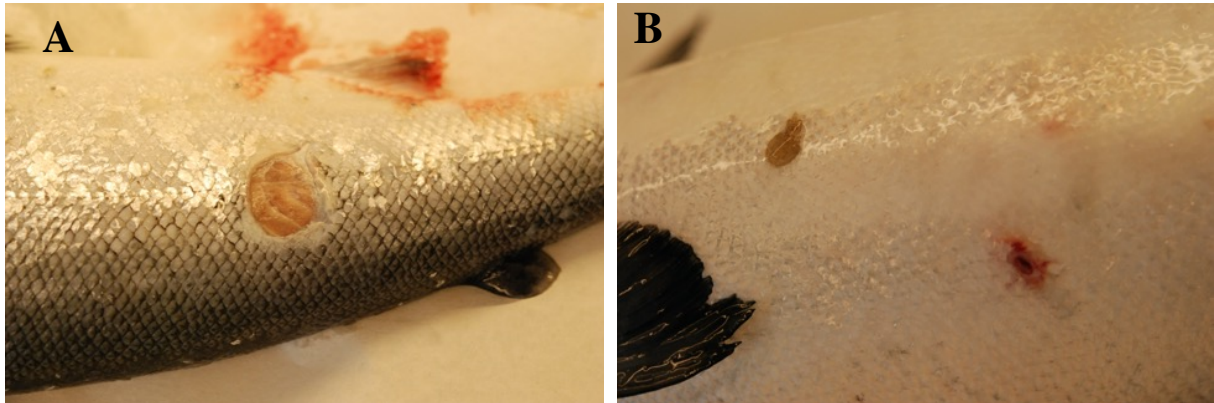
I første prøveuttak var fiskens gjennomsnittlige vekt og lengde 1500 ± 359 gram og $50,5 \pm 4,5$ cm. I andre prøveuttak var fiskens gjennomsnittlige vekt og lengde 1518 ± 510 gram og 50 ± 5 cm. I tredje prøveuttak, 2 uker etter behandling, var fiskens gjennomsnittlige vekt og lengde 2009 ± 377 gram og $54 \pm 3,1$ cm. Dette gir en økning i vekt på 33,9 % fra første prøveuttak. K-faktor har hatt en jevn stigning gjennom de tre prøveuttakene (figur 3.3). Fôring av fisken ble gjenopptatt dagen etter gjennomført behandling og stabiliserte seg til nivået før behandling etter kort tid. Utfôringen dagen etter behandling var på 55,7 % av nivået før behandling.



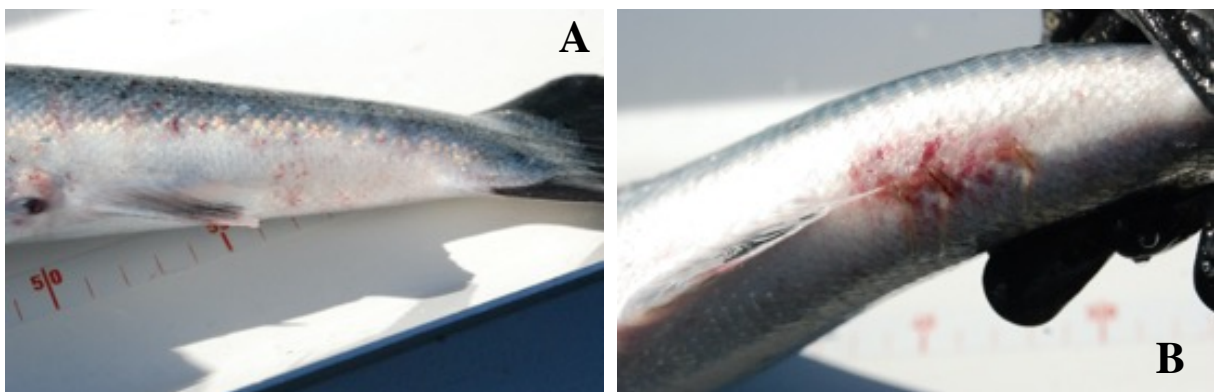
Figur 3.4. Daglig dødelighet i behandlet merd på lokalitet GB før og etter behandling (ferskvann – termisk behandling). Grønn pil = uttak av fisk før behandling (08.06.2022). Rød pil = uttak av fisk 14 dager etter behandling (20.06.2022). N = antall individer.

Den gjennomsnittlige dødeligheten 30 dager før behandling var på 2,5 individer (0,002 %). Det ble registrert 8 døde fisk på behandlingsdagen i den aktuelle merden. Dagene etter behandling

døde det henholdsvis 1, 30, 14 og 10 fisk. Det utgjør i gjennomsnitt en dødelighet på 0,01% de påfølgende fire dagene etter behandlingen. I de resterende dagene etter behandlingen stabiliserte dødeligheten seg til normalen før behandling med et snitt på 2,9 individer (0,003%).

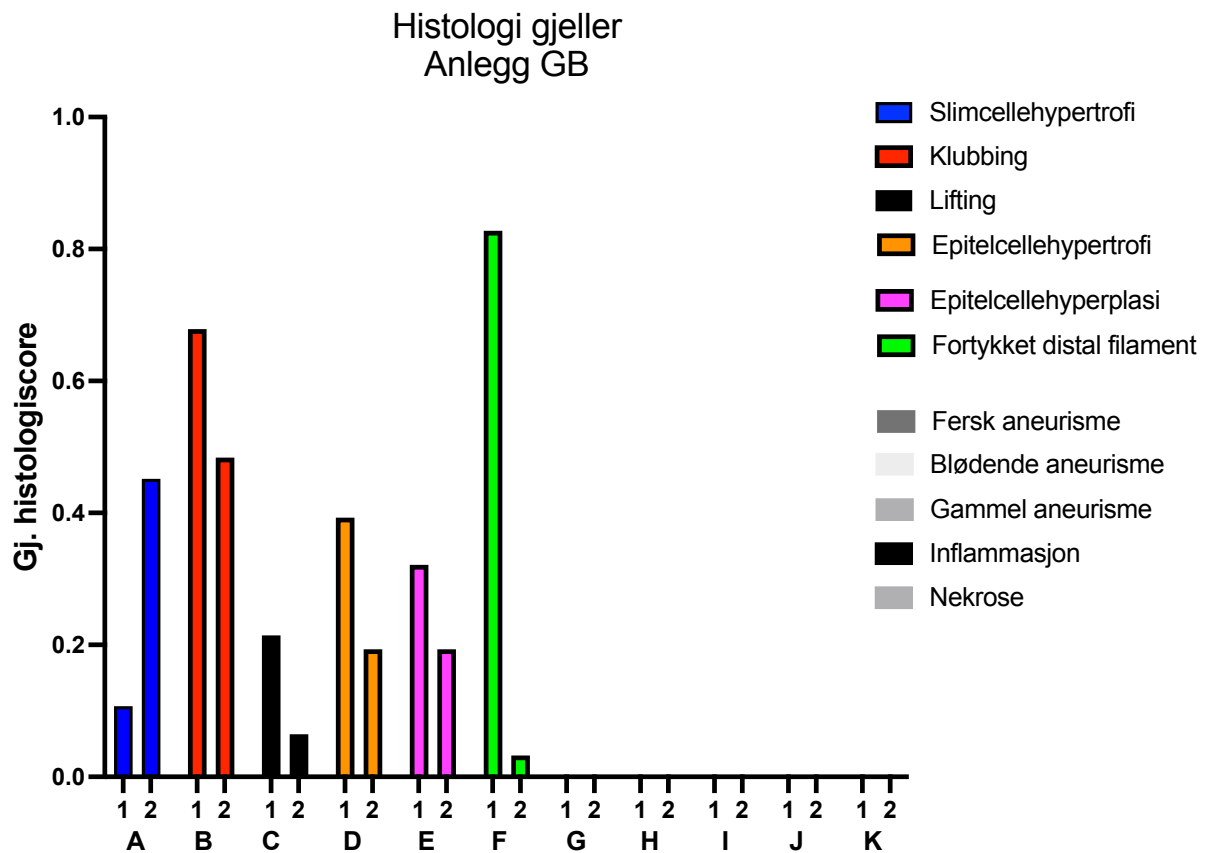


Figur 3.5. Død fisk samlet opp etter gjennomført behandling i anlegg GB. **A:** laks med sår. **B:** sår og *Lepeoptheirus salmonis* bak pectoralfinnen.



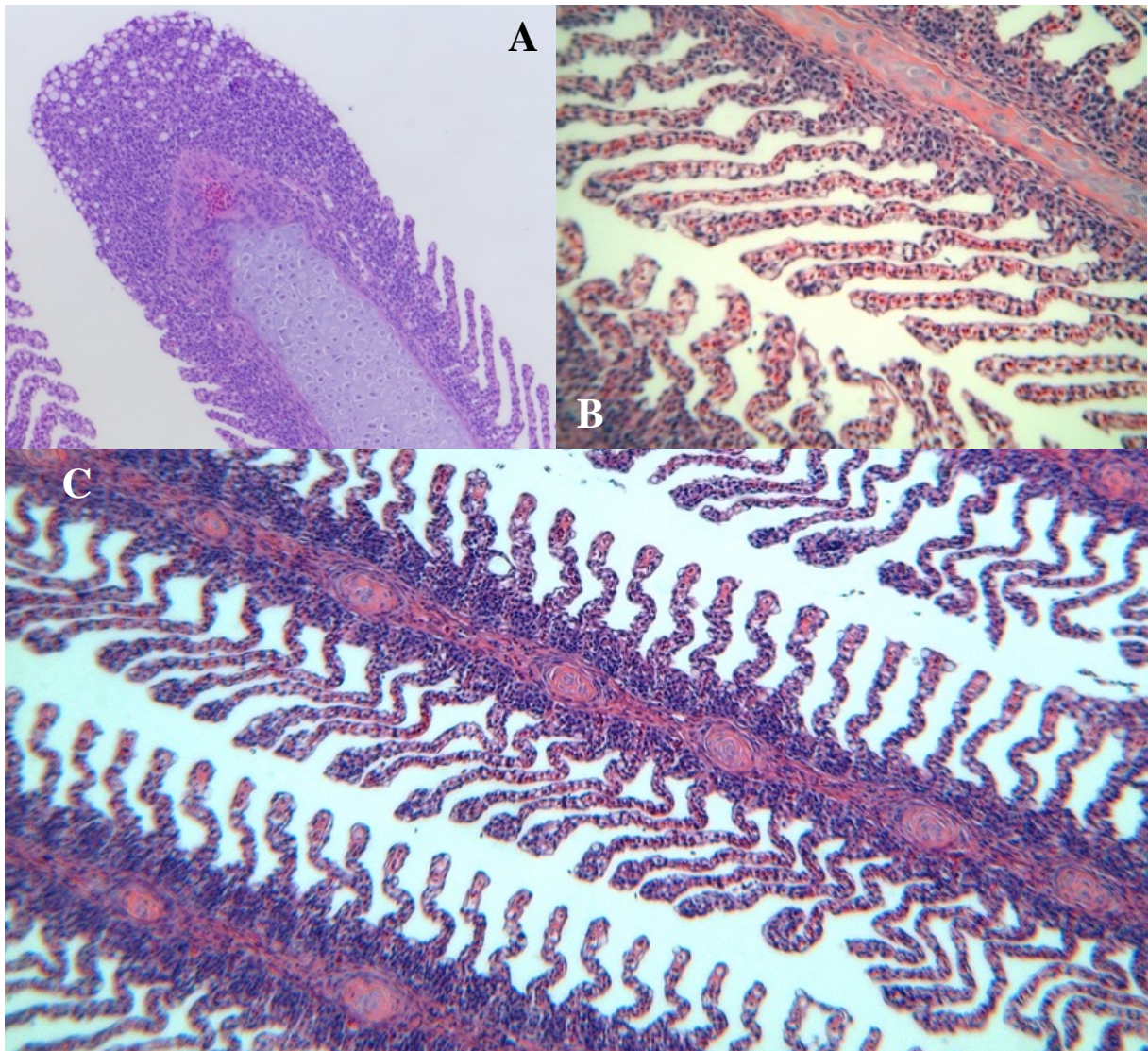
Figur 3.6. Fisk fra prøveuttak to uker etter behandling i anlegg GB. **A:** laks med blodutredning i hud. **B:** laks med beitesår etter tre hunnlus med eggstrenger bak analfinnen.

3.1.2 Histologi



Figur 3.7. Gjennomsnittlig gjellescore på laksen ved to prøveuttak for anlegg GB. «1» er prøveuttaket «før behandling» og «2» er «etter behandling». De elleve patologiske endringene omfatter A: slimcellehypertrofi, B: klubbing, C: lifting, D: epitelcellehypertrofi, E: epitelcellehyperplasi, F: fortykket distalt filament, G: fersk aneurisme, H: blødende aneurisme, I: gammel aneurisme, J: inflammasjon, K: nekrose. Gjellescore ble gitt mellom 0-3. N = 30 for «1». N = 32 for «2».

Histologiske undersøkelser av gjellene viste at disse var mest preget av slimcellehypertrofi, klubbing og fortykket distalt filament (figur 3.7 og 3.8). For disse parameterne ble det også gitt enkelte score 2. Det ble ikke gitt noen score 3. Det eneste parameteret med økt gjennomsnitt etter gjennomført behandling var «slimcellehypertrofi». For de andre patologiske endringene ser man at den gjennomsnittlige scoren har sunket for prøveuttaket «etter behandling».



Figur 3.7. Histologibilder av fisk fra anlegg GB. **A:** Fortykket distal primærlamelle. **B:** Sekundære lameller med slimcellehypertrofi, klubbing og epitelcellehypertrofi. **C:** Sekundære lameller med klubbing og lifting.

3.1.3 RT-PCR

Real time RT PCR analyser av gjeller og nyre.

Prevalens av utvalgte patogener før og etter behandling, samt prevalens hos laks som døde under behandling (tabell 3.1).

Tabell 3.1. Oversikt over real-time RT-PCR resultater av gjeller fra anlegg GB. Tabellen inneholder resultater for tre prøveuttak, før og to uker etter behandling, samt dødfisk. Viser gjennomsnittlig Ct-verdi, rangen for de positive prøvene og prevalensen. N = 30, 30 og 32 for de respektive uttakene.

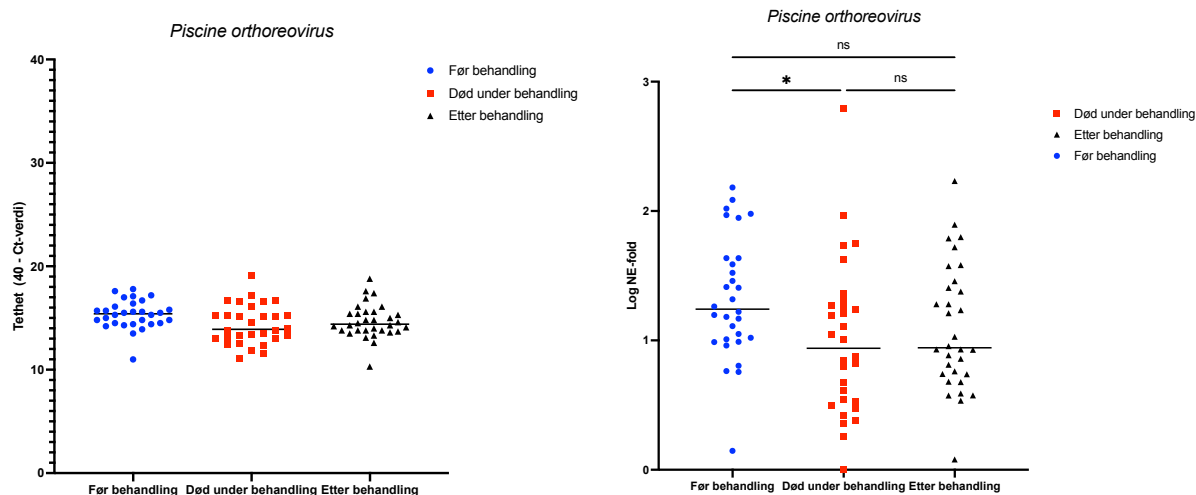
	Ct- verdi			Ct- verdi			Ct- verdi		
	Gj.snitt	Range	% Prevalens	Gj.snitt	Range	% Prevalens	Gj.snitt	Range	% Prevalens
	Før			Død			Etter		
Virus									
Sav	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
ISAV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
PRV1	24,7	22,2 - 29,0	100	25,6	20,9 - 28,9	100	25,3	21,2 - 29,7	100
PMCV	31,54	24,7 - 38,4	6,7	34	25,2 - 36,5	33,3	36,8	36,8	3,3
SGPV	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
IPNV	35,31	35,3	3,3	35,42	32,8 - 38,1	6,7	Neg	Neg	Neg
Parasitter									
<i>P. theridion</i>	22	17,6 - 27,5	100	21,5	15,3 - 27,7	100	22,2	16,4 - 28,2	100
<i>P. perurans</i>	31,1	31,1	3,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>Costia</i>	16,3	9,7 - 20,0	100	16,7	7,3 - 22,7	100	15,5	10,9 - 19,9	100
<i>P. Pseudobr.</i>	34,17	34,17	3,3	34,35	33,1 - 36,5	13,3	34,2	30,7 - 37,3	13,3
Bakterier									
<i>Ca. B. cysticola</i>	15,5	10,1 - 20,3	100	15,6	9,9 - 20,1	100	18,2	14,6 - 20,6	100
<i>Ca. P. salmonis</i>	27,9	24,3 - 34,1	100	33,6	31,8 - 35,1	100	30,8	16,9 - 36,4	23,3
<i>Y. ruckeri</i>	35,73	34,1 - 37,3	30,0	33,1	31,2 - 35,3	13,3	35	35	3,3

Analyse av de 92 prøvene viste negativt resultat for Salmonid alfavirus (SAV), Salmonid gjellepoxvirus (SGPV), infeksjons lakseanemivirus (ISAV) og PKX.

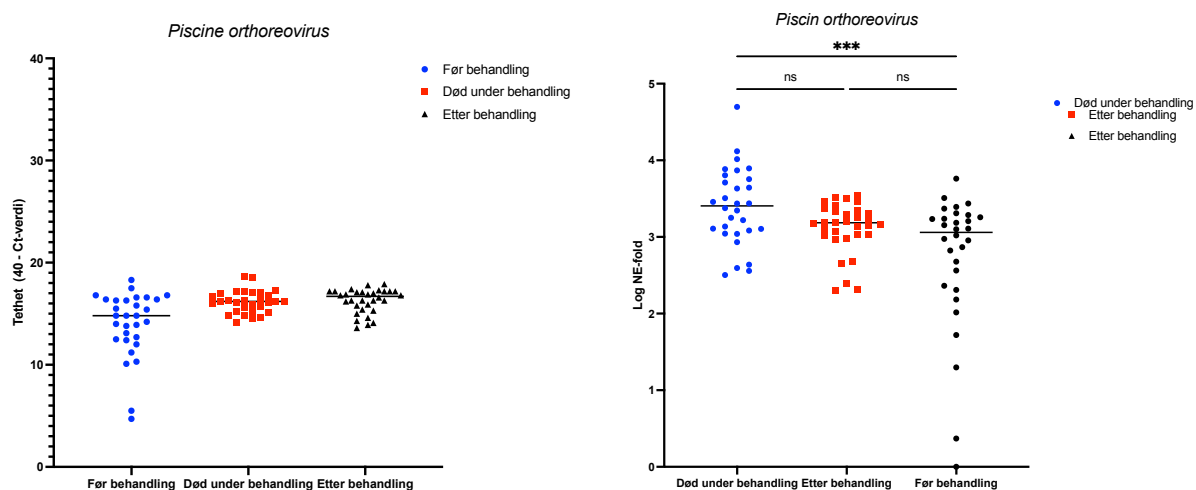
Blant de analyserte nyre- og gjelleprøvene var det positive resultater for *Piscine orthoreovirus* (PRV-M2), *Piscine myokardittvirus* (PMCV), *Paranucleospora theridion* (Nuc), *Candidatus Piscichlamydia salmonis* (Pch) og *Candidatus Branchiomonas cysticola* (Epi) og *Ichthyobodo* spp. (*Costia*) og, *Paramoeba perurans*, infeksjons pankreasnekrosevirus (IPNV). De to sistnevnte hadde få positive resultater og høye Ct-verdier.

Piscine orthoreovirus (PRV1)

Prevalensen for PRV1 var 100 % i både gjelle- og nyrevev. Tettheten i analysert gjellevev var høyest før behandling ($P \leq 0.05$) (figur 3.9). Det var ingen signifikant forskjell i tetthet mellom uttakene «død under behandling» og «to uker etter behandling». Analyse av nyrevev viser en signifikant minskning i tetthet mellom de tre uttakene ($P \leq 0.001$) (Figur 3.10).



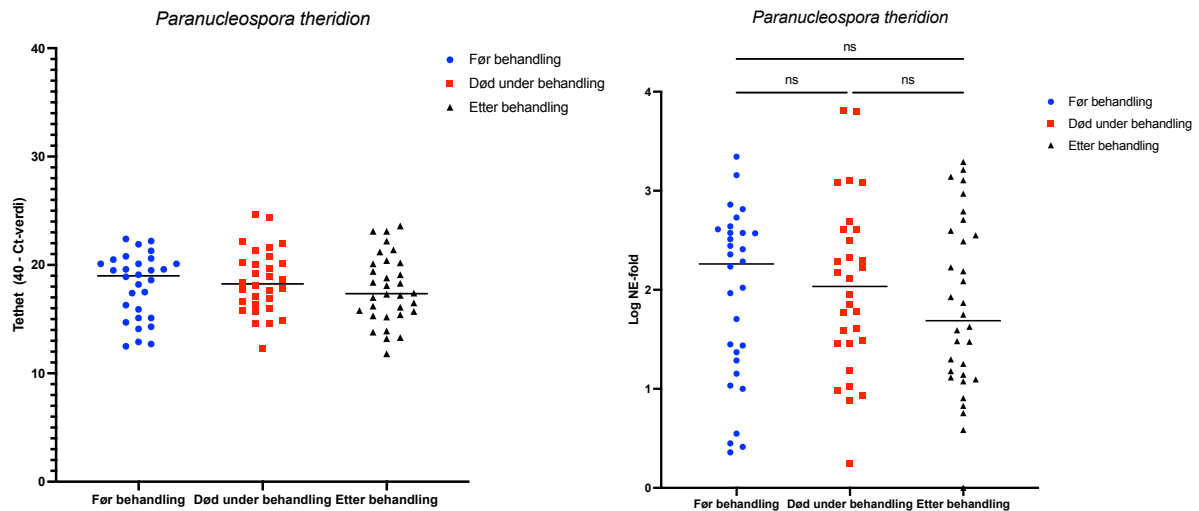
Figur 3.9 Tetthet av PRV1 på gjellene hos laks fra anlegg GB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 32 for «etter behandling». * P ≤ 0.05, ns = no significance.



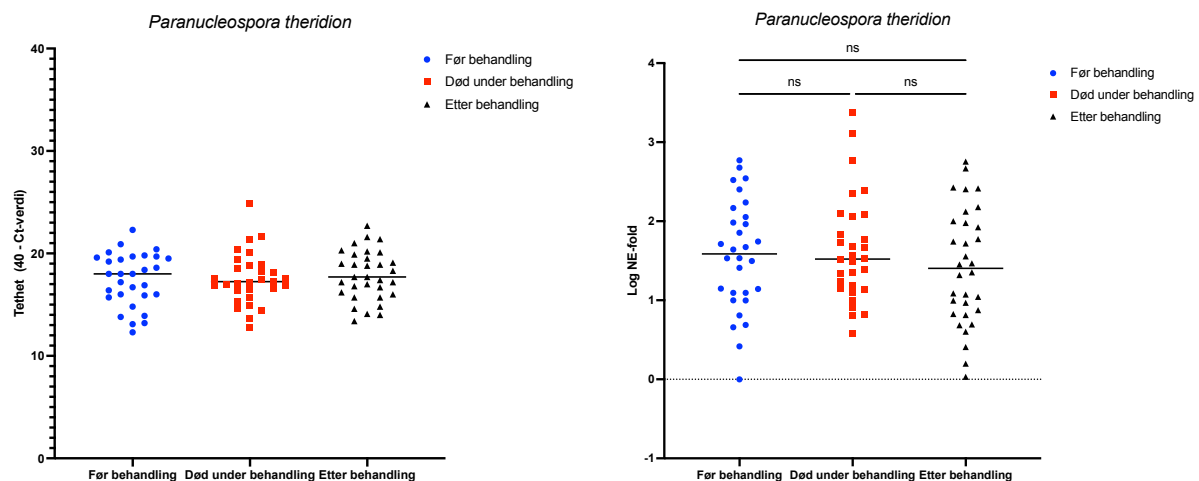
Figur 3.10 Tetthet av PRV1 i nyrene hos laks fra anlegg GB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 32 for «etter behandling». *** P ≤ 0.001, ns = no significance.

Paranucleospora theridion

Prevalensen for *Paranucleospora theridion* var 100 % for alle tre uttakene. Det er lite forskjeller i tettheten mellom gruppene. I gjellene er det ingen signifikante forskjeller (figur 3.11). Det samme gjaldt for analysene av nyrevevet (3.12).



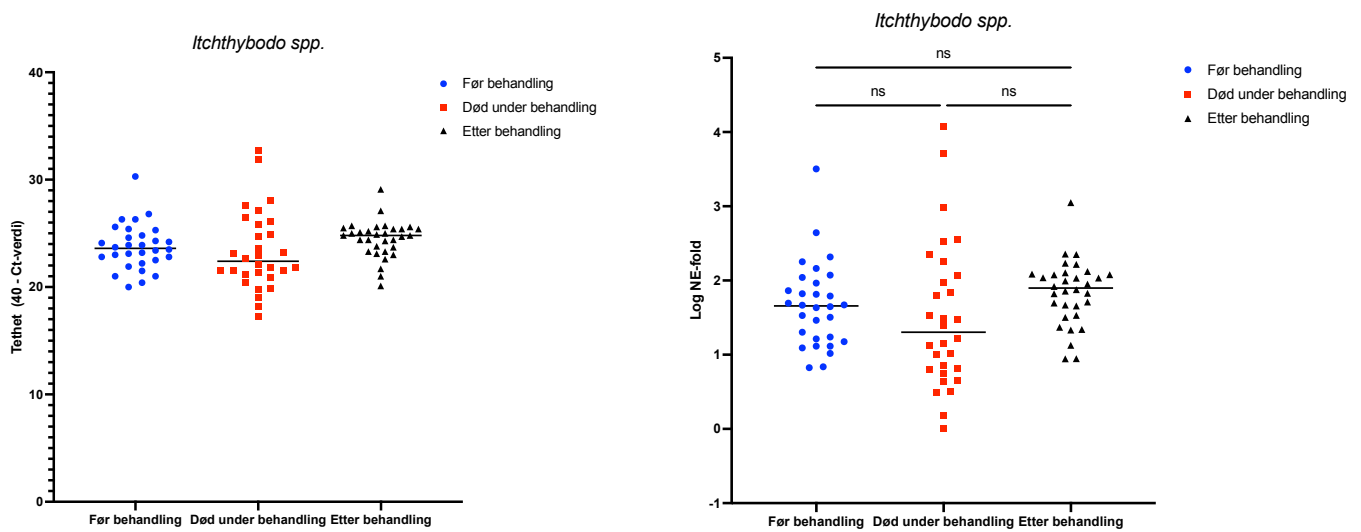
Figur 3.11 Tetthet av *Paranucleospora theridion* i gjelle hos laks fra anlegg GB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 32 for «etter behandling». Ns = no significance.



Figur 3.12 Tetthet av *Paranucleospora theridion* i nyre hos laks fra anlegg GB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 32 for «etter behandling». Ns = no significance.

Ichthyobodo spp.

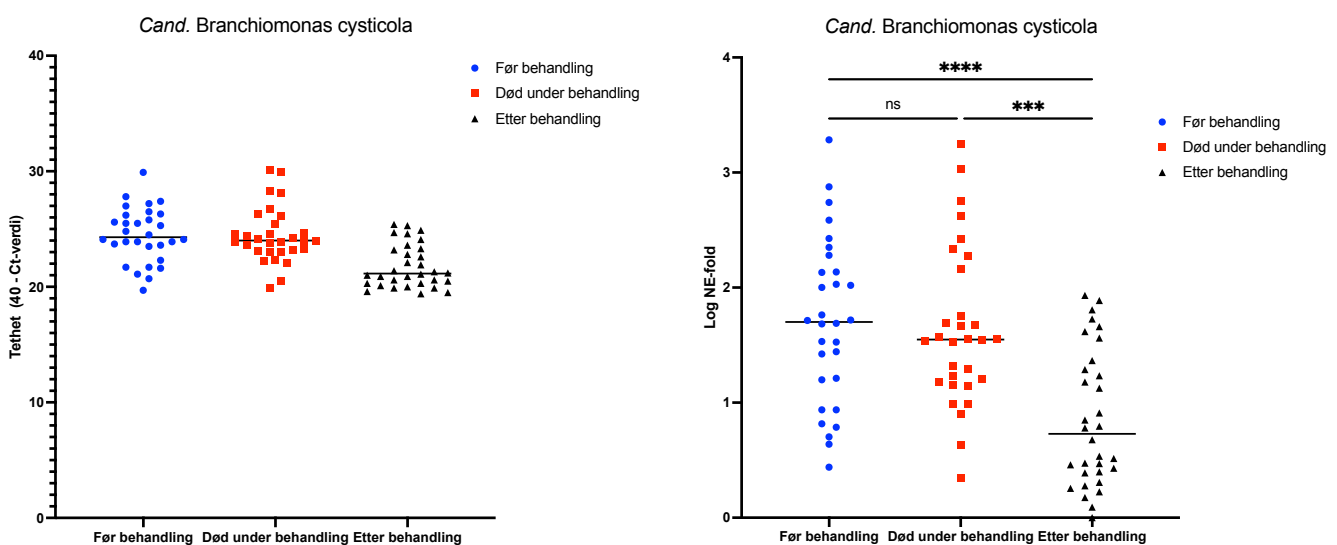
Prevalensen for *Ichthyobodo* spp. på gjellene var 100 % for alle gruppene. Det var ingen signifikante forskjeller i tetthet mellom uttakene (figur 3.13).



Figur 3.13 Tetthet av *Ichthyobodo* spp. i gjellevev hos laks fra anlegg GB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 32 for «etter behandling». Ns = no significance.

Candidatus Branchiomonas cysticola

Prevalensen for *Candidatus* Branchiomonas cysticola var 100 % i gjellevev. Tettheten i analysert gjellevev var høyest før behandling (Figur 3.14). Tettheten for *B. cysticola* har en signifikant minskning mellom første og siste uttak.



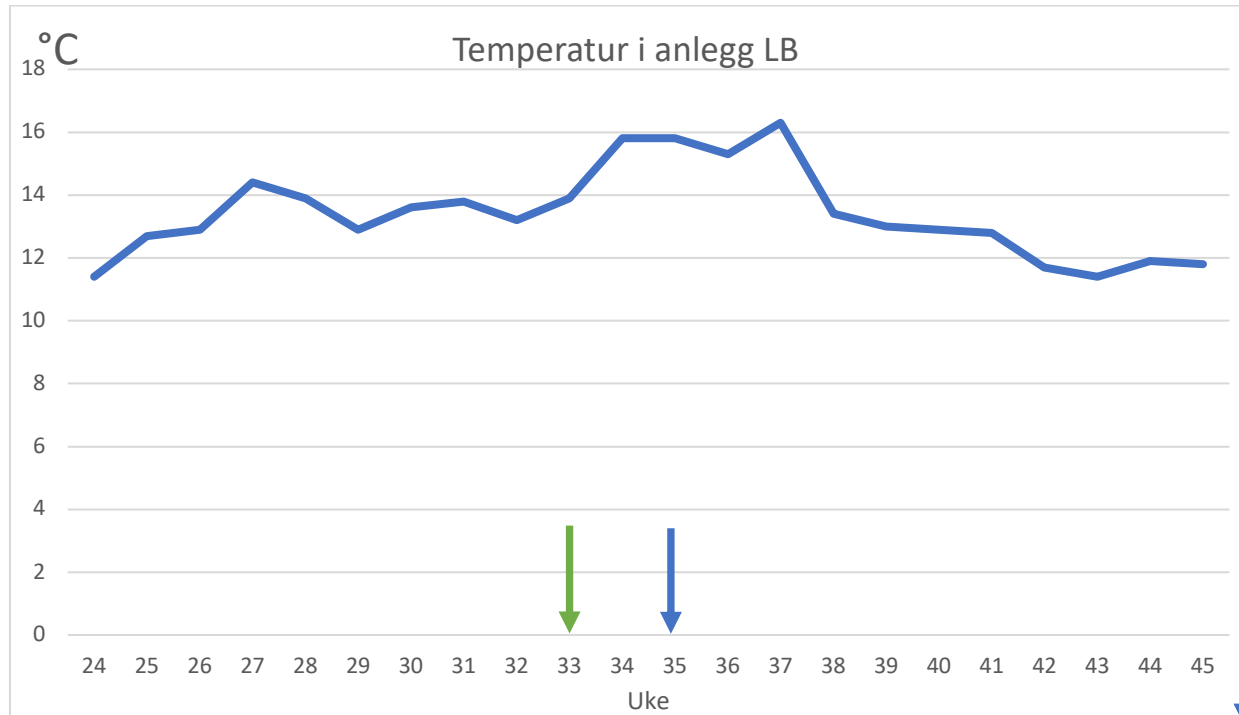
Figur 3.14 Tetthet av *Candidatus* Branchiomonas cysticola i gjellevev hos laks fra anlegg GB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40

– Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». *** $P \leq 0.001$ og **** $P \leq 0.0001$.

3.2 Anlegg LB

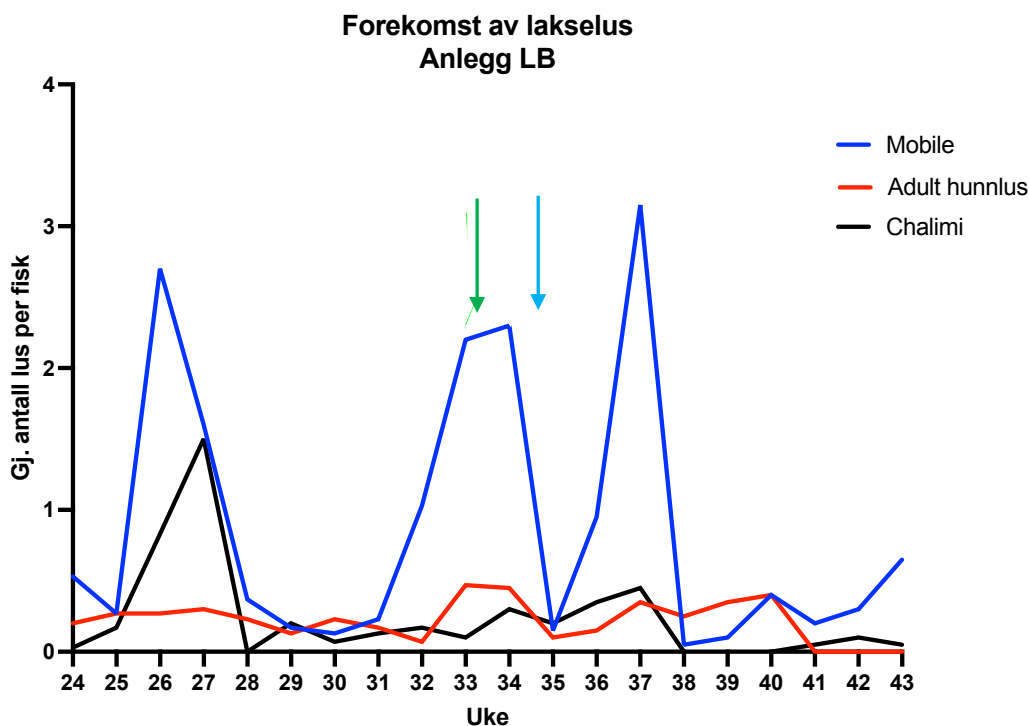
3.2.1 Abiotiske faktorer

Sjøtemperatur i forkant, under og etter termisk behandling av laks på lokalitet LB (figur 3.15).



Figur 3.15: Oversikt over temperatur i sjø i anlegget LB i 2022 i forkant av behandling, under behandling og etter behandling. Uttak av laks før behandling (grønn pil) uttak av laks etter behandling (blå pil). Data hentet fra BarentsWatch.

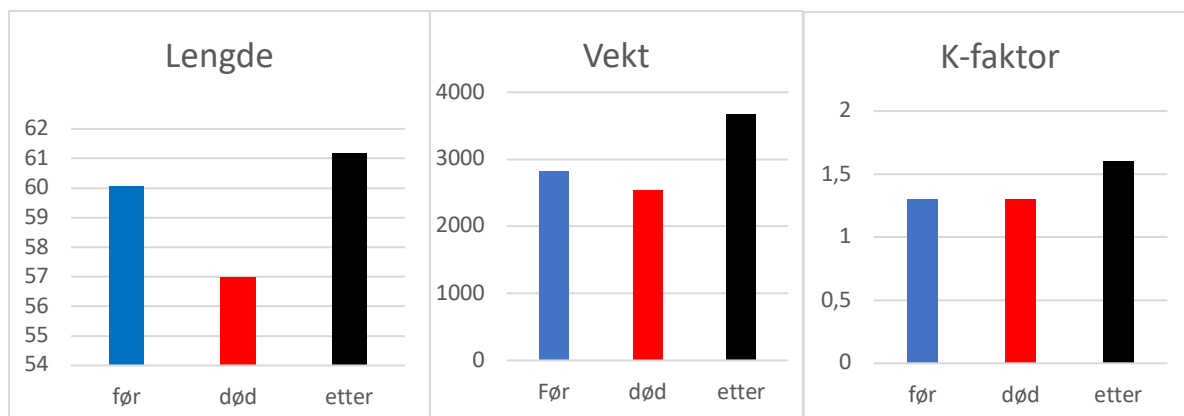
Lakselus ble registrert på fisken før og etter behandling (og hos død fisk) og i tillegg er det hentet inn lakselusdata fra BarentsWatch (figur 3.16). Telling av bevegelige stadier av lakselus uke 34 2022 (før behandling) gav en gjennomsnittlig verdi på 2,3 lus/fisk, mens det gjennomsnittlige antall lus hos død fisk (etter behandling) va 0,15 lus/fisk. I uttaket 11 dager etter behandling ble det registrert 0,95 lus/fisk.



Figur 3.16 Antall lakselus før, under og etter termisk behandling. Uttak av laks før behandling i uke 33 (grønn pil), uttak av laks etter behandling i uke 35 (blå pil). Data hentet fra BarentsWatch.

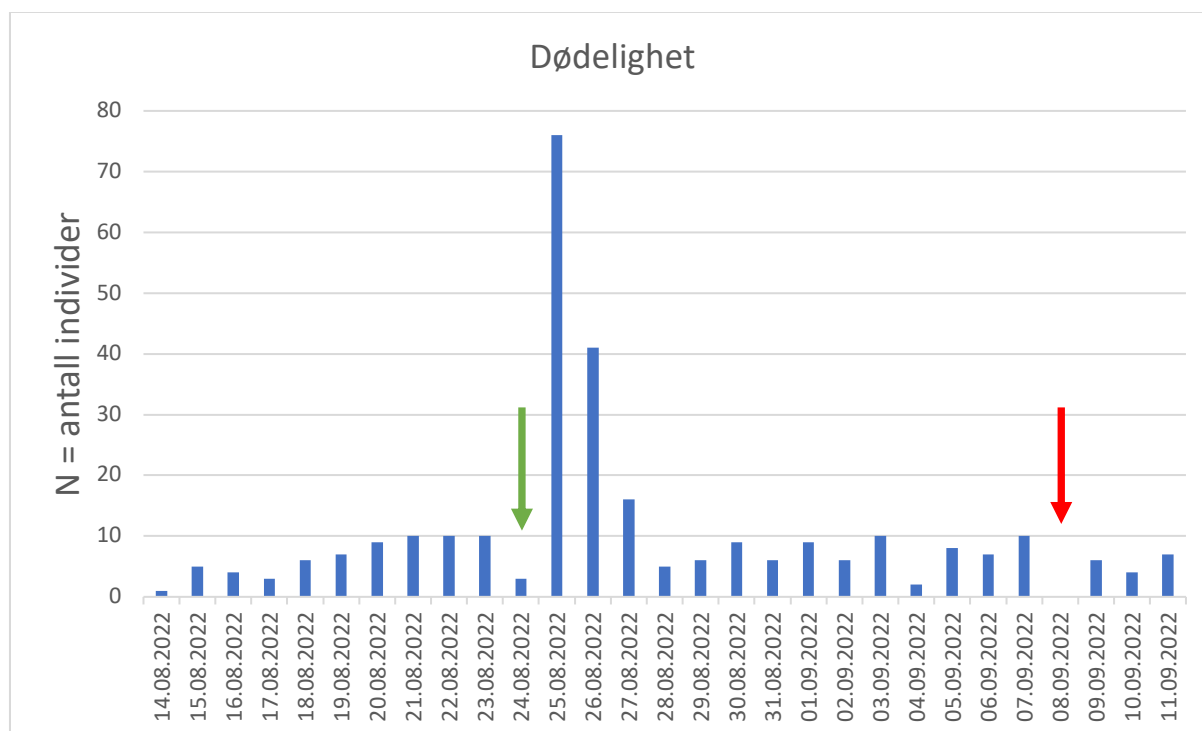
Makroskopisk gjellescore ble gjennomført før og etter termisk behandling. Begge sidene av gjellebuene på venstre side ble inkludert i evaluering av den makroskopiske gjellehelsen. Før behandling ble det observert gjellescore på 5 av 30 (16,6 %) laks hvor maksimal score på en gjelleside var 2. 14 dager etter behandling ble det observert gjellescore på 12 av 32 (37,5 %) undersøkte individer. Her var maksimal score 2 på to gjelleflater.

Den gjennomsnittlige vekt, lengde og kondisjonsfaktor før og etter behandling samt hos fisk som døde under behandling kommer frem av figur 3.17. Død fisk etter behandling hadde gjennomsnittlig lavere vekt og lengde. Fisken hadde likevel en signifikant økning i vekt og lengde mellom behandling og siste prøveuttak 14 dager senere.



Figur 3.17. Vekt, lengde og kondisjonsfaktor hos laks i anlegg LB før og etter termisk behandling, samt hos død fisk.

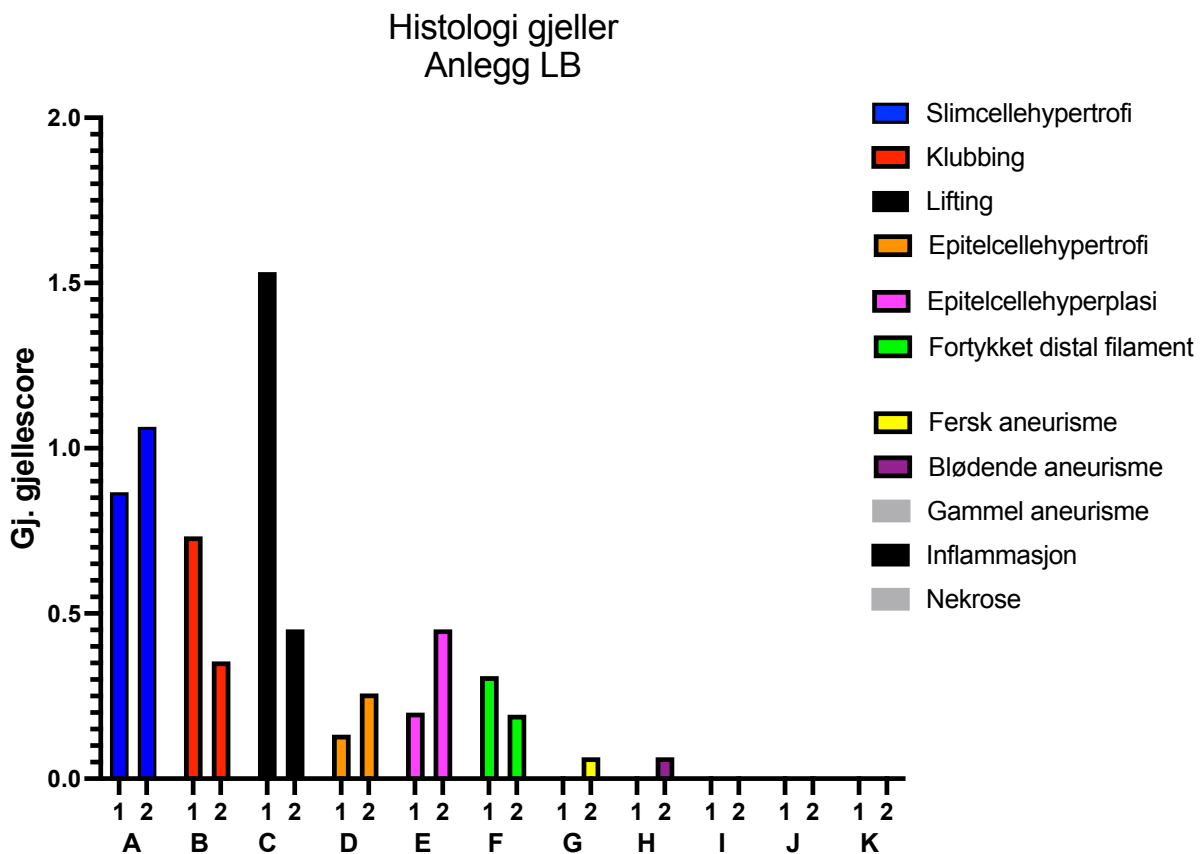
I første prøveuttak var fiskens gjennomsnittlige vekt og lengde 2822 ± 602 gram og $60 \pm 4,25$ cm. I andre prøveuttak var fiskens gjennomsnittlige vekt og lengde 2543 ± 763 gram og 57 ± 6 cm. I tredje prøveuttak, 2 uker etter behandling, var fiskens gjennomsnittlige vekt og lengde 3669 ± 819 gram og $61 \pm 5,3$ cm. Dette gir en økning i vekt på 30,0 % fra første prøveuttak. Fôring av fisken ble gjenopptatt dagen etter gjennomført behandling og stabiliserte seg til nivået før behandling etter kort tid. Utfôringen dagen etter behandling var på 40,5 % av nivået før behandling.



Figur 3.18. Daglig dødelighet i behandlet merd på lokalitet LB før og etter behandling (ferskvann – termisk behandling). Grønn pil = uttak av fisk før behandling (24.08.2022). Rød pil = uttak av fisk 14 dager etter behandling (08.09.2022). N = antall individer.

Den gjennomsnittlige dødeligheten 31 dager før behandling var 10,9 individer (0,02 %). På behandlingsdagen og de påfølgende tre dagene døde det i gjennomsnitt 44,3 individer. Det utgjorde 0,08 % av det totale antallet fisk i merden. I perioden frem til siste prøveuttak (08.09.22) lå dødeligheten i gjennomsnitt på 6,5 individer (0,01 %). Behandlingen førte ikke til betydelig dødelighet (figur 3.18)

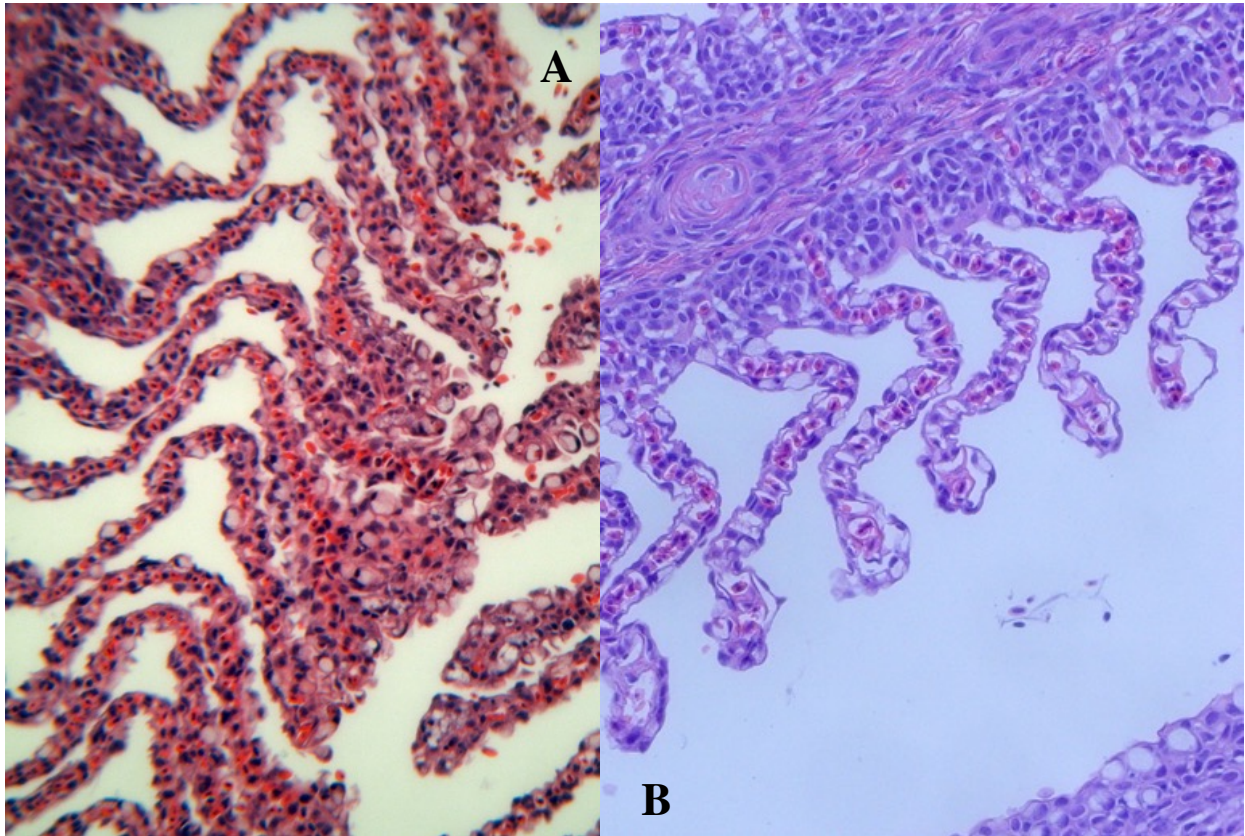
3.2.2 Histologi



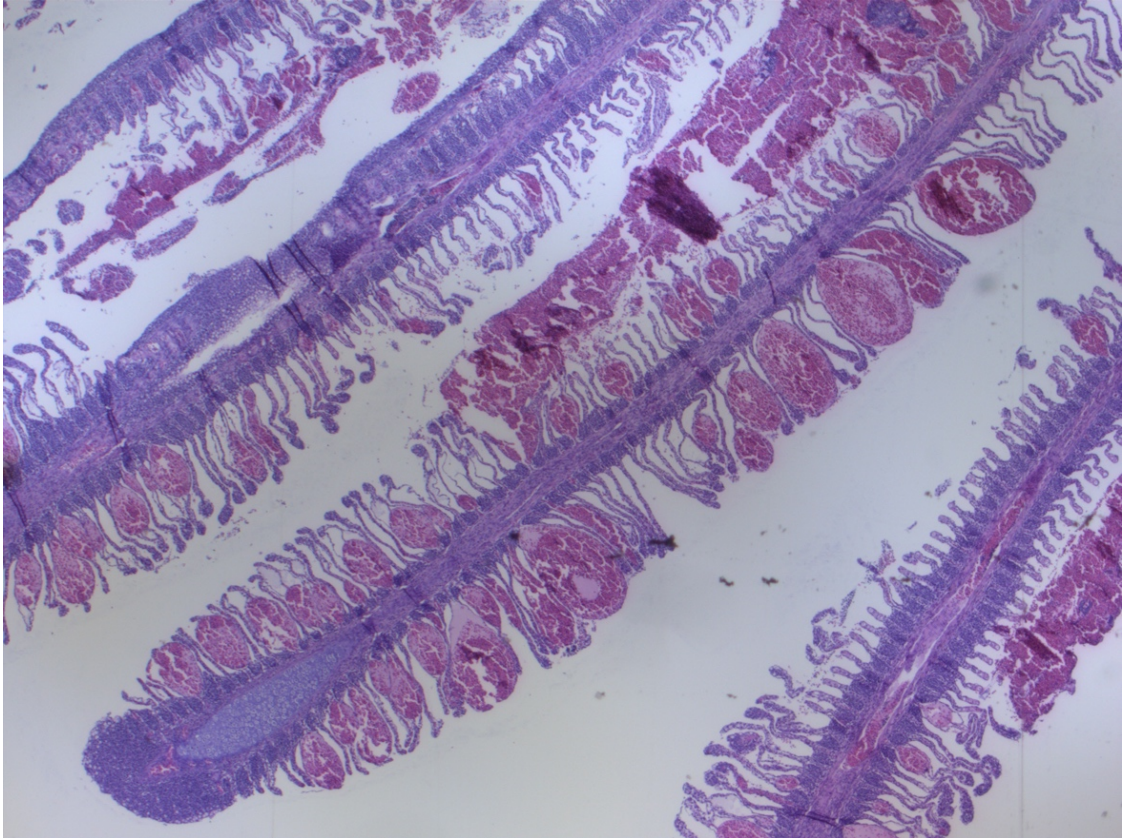
Figur 3.19. Gjennomsnittlig gjellescore på laksen ved to prøveuttak for anlegg LB. «1» er prøveuttaket «før behandling» og «2» er «etter behandling». De elleve patologiske endringene omfatter **A:** slimcellehypertrofi, **B:** klubbing, **C:** lifting, **D:** epitelcellehypertrofi, **E:** epitelcellehyperplasi, **F:** fortykket distalt filament, **G:** fersk aneurisme, **H:** blødende aneurisme, **I:** gammel aneurisme, **J:** inflammasjon, **K:** nekrose. Gjellescore ble gitt mellom 0-3. N = 30 for «1». N = 31 for «2».

Histologiske undersøkelser av gjellene viste at gjellene var mest preget av slimcellehypertrofi, klubbing og lifting (figur 3.19). For disse parameterne ble det gitt enkelte score 2. Funn av

lifting gav to score 3. Parameterne som hadde økt gjennomsnitt etter behandling er slimcellehypertrofi, epitelcellehypertrofi og epitelcellehyperplasi. Undersøkelsene viste få fisk med aneurismer, men én fisk hadde ferske aneurismer tilsvarende score 2, og to fisk hadde blødende aneurismer tilsvarende score 1. Fiskene med aneurismer tilhørte prøveuttaket «etter behandling». For de andre patologiske endringene ser man at den gjennomsnittlige scoren har sunket for prøveuttaket «etter behandling».



Figur 3.20. A: Sekundære lameller med kraftig slimcellehypertrofi, klubbing og epitelcellehyperplasi. B: Sekundære lameller med lifting, slimcellehypertrofi og epitelcellehyperplasi.



Figur 3.21. Primærlameller kraftig affisert med aneurismer og klubbing to uker etter behandling.

3.2.3 RT-PCR

Prevalens av utvalgte patogener før og etter behandling, samt prevalens hos laks som døde under behandling (figur 3.22). Det var 100% prevalens i de tre uttakene for PRV, *Candidatus Branchiomonas cysticola*, *Candidatus Piscichlamydia salmonis* og *Paranucleospora theridion*.

Tabell 3.2. Oversikt over real-time RT-PCR resultater av gjeller fra anlegg LB. Tabellen inneholder resultater for tre prøveuttak, før og to uker etter behandling, samt dødfisk. Viser gjennomsnittlig Ct-verdi, rangen for de positive prøvene og prevalensen. N = 30 for de respektive uttakene.

	Ct- verdi			Ct- verdi			Ct- verdi		
	Gj.snitt	Range	% Prevalens	Gj.snitt	Range	% Prevalens	Gj.snitt	Range	% Prevalens
	Før			Død			Etter		
Virus									
Sav	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
ISAV	Neg	Neg	3,3	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0
PRV1	27,3	23,5 - 30,1	100	25	20,9 - 29,3	100	24,4	20,4 - 31,4	100
PMCV	26,9	20,6 - 34,9	100	27,2	19,7 - 36,4	100	27,1	22,4 - 36,4	93,5
SGPV	Neg	Neg	0	29,2	22,3 - 36,1	16,7	Neg	Neg	0
IPNV	36	36	3,3	neg	neg	0	36,5	36,5	3,2
Parasitter									
<i>P. therdion</i>	23,3	18,2 - 29,8	100	22	11,4 - 30,0	100	23,3	17,5 - 28,2	100
<i>P. perurans</i>	30,5	21,0 - 34,5	70	29,6	26,1 - 33,7	13,3	Neg	Neg	0
<i>Costia</i>	24,3	19,6 - 32,6	100	20,7	16,7 - 29,5	100	28,5	19,8 - 33,7	74,4
<i>P. Pseudobr.</i>	29,2	17,0 - 33,5	76,7	29,7	25,5 - 33,3	76,7	32,9	27,9 - 36,9	64,5
Bakterier									
<i>Ca. B. cysticola</i>	17,5	13,2 - 21,3	100	16,1	7,3 - 22,9	100	19,1	13,3 - 23,9	100
<i>Ca. P. salmonis</i>	20,4	17,9 - 23,2	100	21	18,0 - 30,7	100,0	19	15,5 - 23,2	100
<i>Y. ruckeri</i>	neg	neg	0,0	26,6	20,4 - 30,5	23,3	34,7	34,7	3,2

Analyse av de 90 prøvene viste negativt resultat for Salmonid alfavirus (SAV), Salmonid gjellepoxvirus (SGPV) og parasitten *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKX). Det var én positiv prøve for Infeksiøs lakseanemi virus (ISAV) hos fisk før behandling (Ct 38,9). Analyse av gjellevev for bakterien *Yersinia* gav syv positive resultater i uttaket «død under behandling» og én positiv i gruppen «etter behandling». Analyse for SGPV ga fem positive utslag i gruppen «under behandling» i gjellevev.

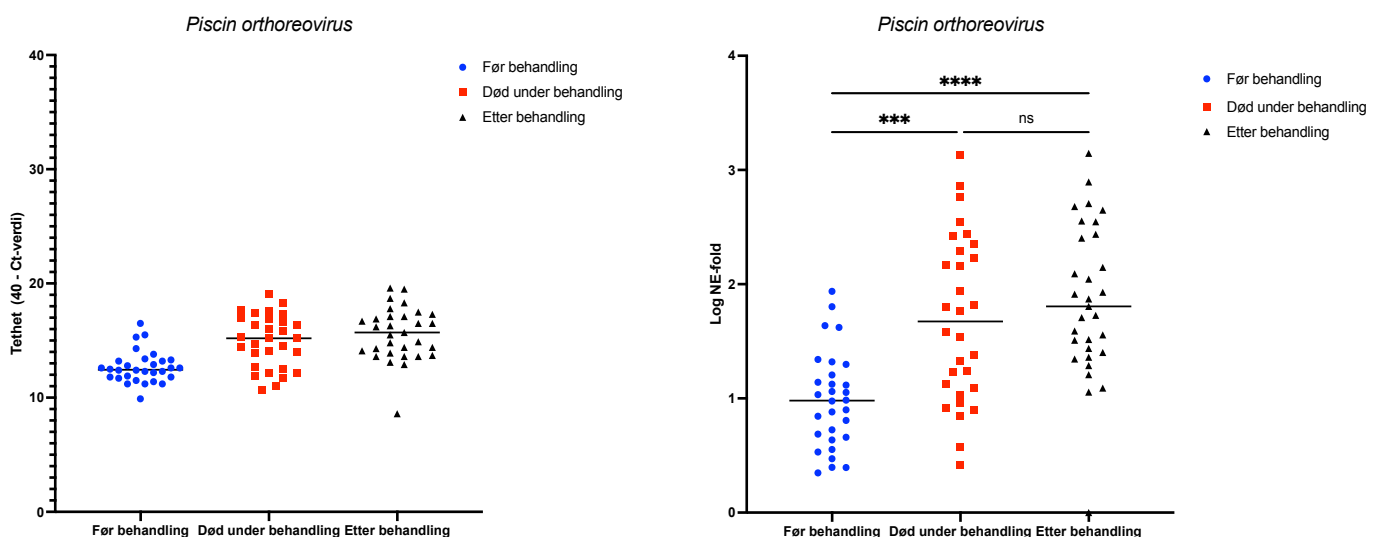
Analyse av gjellevev for Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV) viste to positive individer i prøveuttaket «før behandling», én i «under behandling» og fire i «etter behandling». Resultatet fra analyse av nyrevev ga to positive resultater i «før behandling», og åtte i «under behandling» og «etter behandling». Alle positive resultater for IPNV i nyrevev hadde en Ct-verdi mellom 34,0 og 37,4.

Resultatene av analyse for *Tenacibaculum* spp. (Tb-tuf) ga ett positivt resultat i gruppen «under behandling» i nyrevev (Ct-verdi 36,0).

Blant de analyserte nyre- og gjelleprøvene var det positive resultater for *Piscine orthoreovirus* (PRV-M2), *Piscine myokardittvirus* (PMCV), *Paranucleospora theridion* (Nuc), *Candidatus Piscichlamydia salmonis* (Pch) og *Candidatus Branchiomonas cysticola* (Epit), *Ichthyobodo* spp. (Costia) og *Paramoeba perurans*. Sistnevnte hadde en prevalens på gjellene på 70 % i uttaket «før behandling», 13 % prevalens i uttaket «død etter behandling» og ingen positive analyser i uttaket «to uker etter behandling» (tabell 3.2).

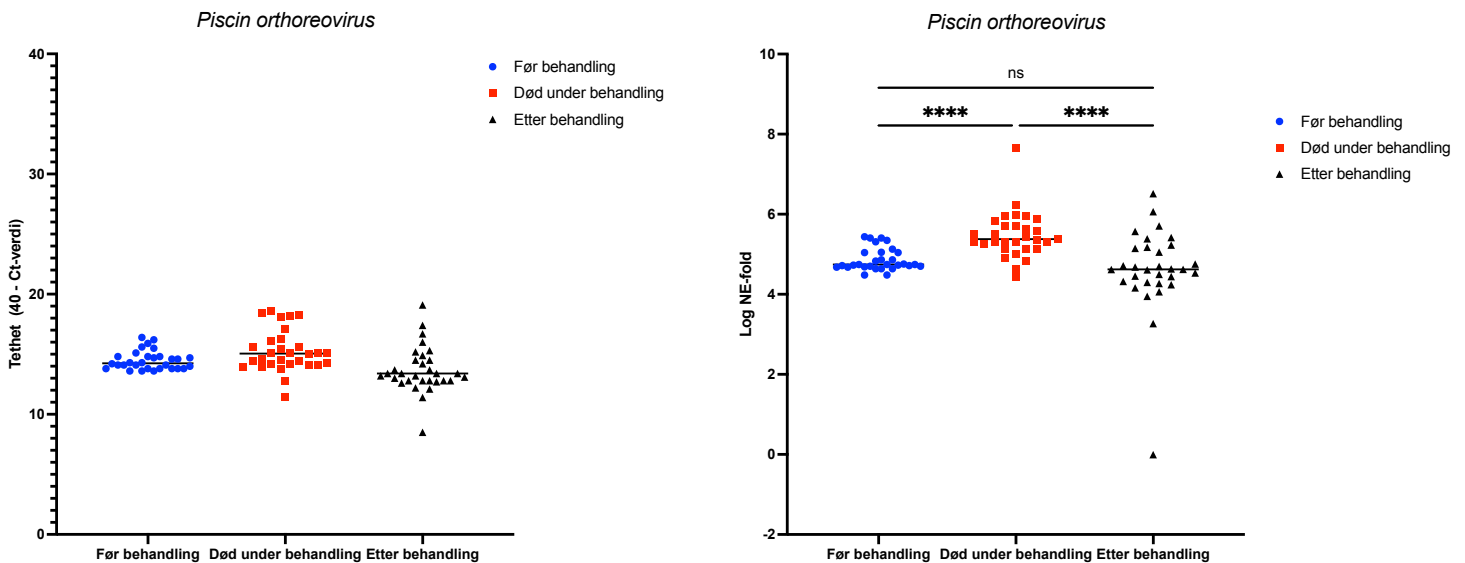
Piscine orthoreovirus

Prevalensen for *Piscine orthoreovirus* (PRV1) var 100 % i både gjelle- og nyrevev. Tettheten i analysert gjellevev var høyest to uker etter behandling ($P \leq 0.0001$) (Figur 3.22). Tettheten for PRV har en signifikant økning mellom første og siste uttak. I nyrevevet var det totalt sett ingen signifikant forskjell i densitet for PRV1 mellom de tre uttakene. Analysene viser økt tetthet mellom uttaket «før behandling» og «død under behandling» ($P \leq 0.0001$) (Figur 3.23). Tettheten mellom uttakene «død under behandling» og «etter behandling» viser en signifikant minskning ($P \leq 0.0001$).



Figur 1.22. Tetthet av PRV1 på gjellene hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling»

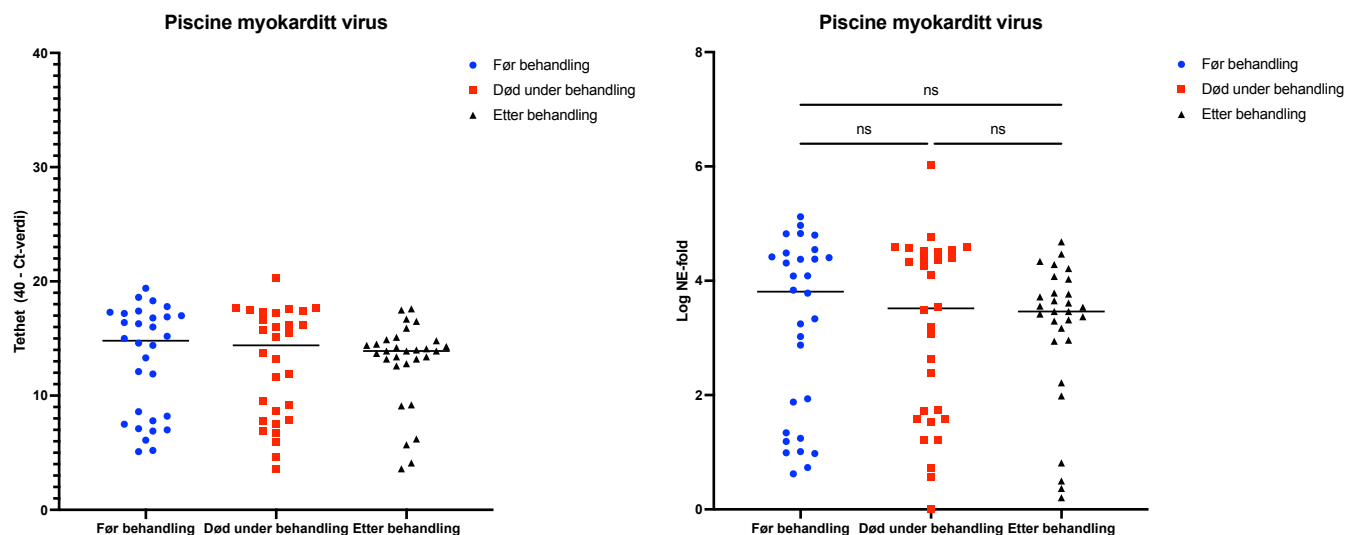
og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». *** $P \leq 0.001$ og **** $P \leq 0.0001$, ns = no significance.



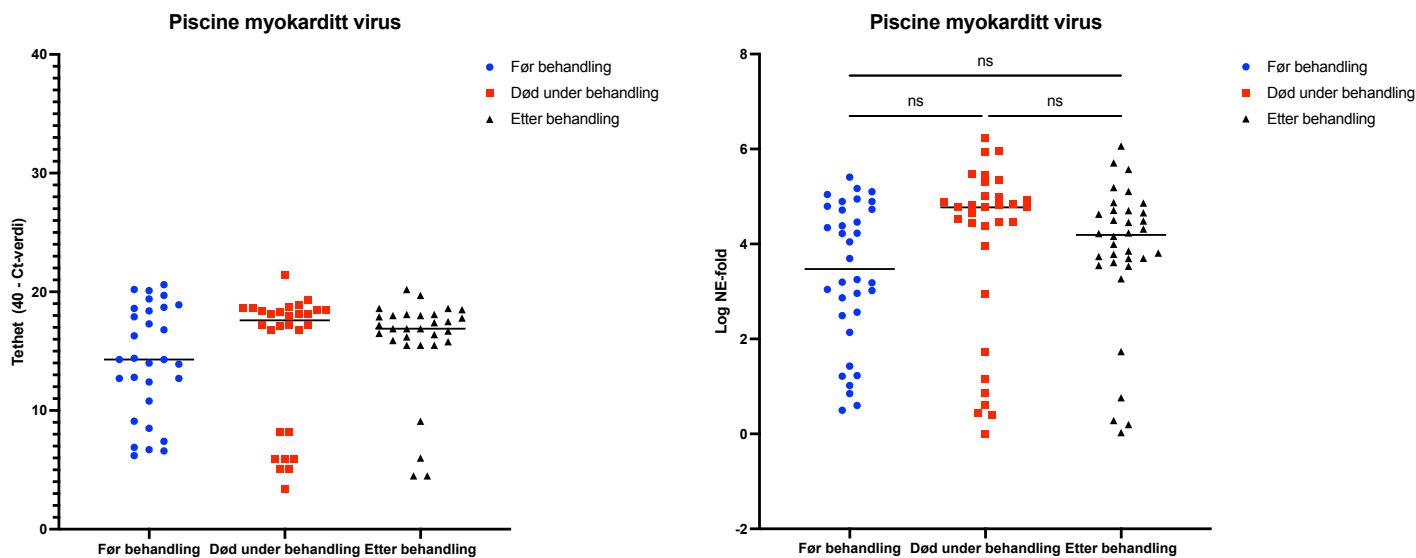
Figur 3.23. Tetthet av PRV1 i nyre hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - Ct$ -verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». **** $P \leq 0.0001$, ns = no significance.

Piscine myokarditt virus (PMCV)

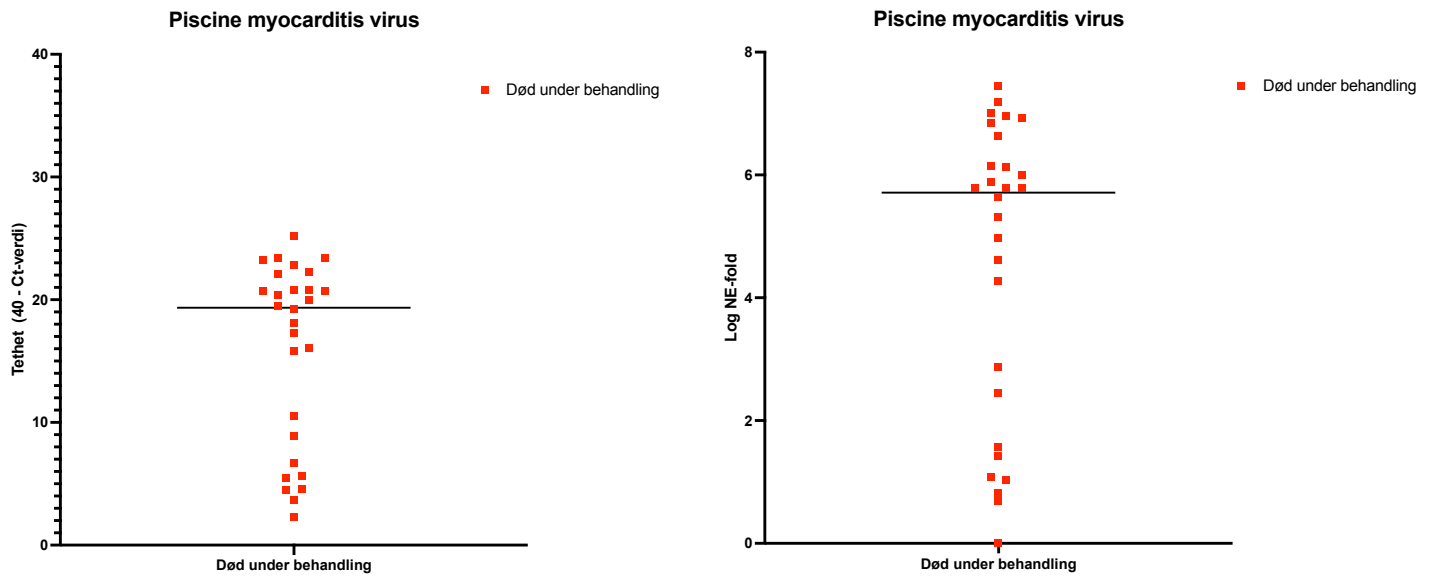
Prevalensen for PMCV var 100 % i uttakene «før behandling» og «under behandling». Prevalensen for uttaket «etter behandling» var på 93,5 %. Det er ingen signifikante forskjeller i tettheten mellom de tre uttakene for PRV i verken gjelle- eller nyrevev. I nyrene er den laveste tettheten i uttaket «før behandling» (figur 3.25). Man kan se en økning i tetthet for gruppen «under behandling», etterfulgt av en minskning i uttaket to uker senere, «etter behandling». Det ble også gjort prøveuttak av hjertet fra fisken i uttaket «død under behandling». Analyse av hjertevevet ga 28 positive individer for PMCV (figur 3.26). Den gjennomsnittlige Ct-verdien for PMCV i hjertet var 24,1. Rangen for PMCV i hjertet lå på 14,8-37,7.



Figur 3.24. Tetthet av PMCV i gjelle hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - Ct$ -verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. $N = 30$ for gruppene «før behandling» og «død under behandling». $N = 31$ for «etter behandling». Ns = no significance.



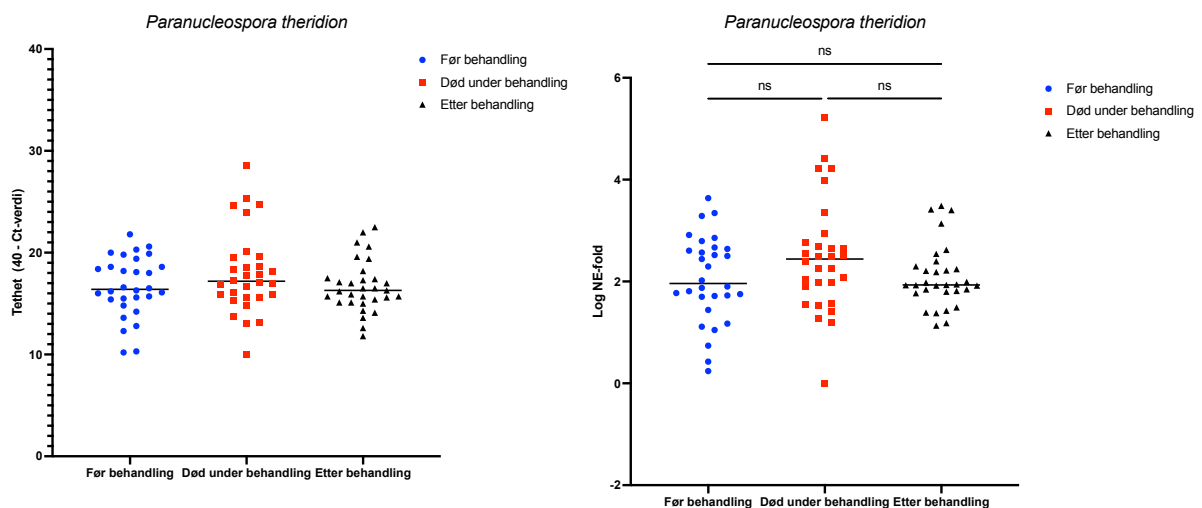
Figur 3.25. Tetthet av PMCV i nyre hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - Ct$ -verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. $N = 30$ for gruppene «før behandling» og «død under behandling». $N = 31$ for «etter behandling». Ns = no significance



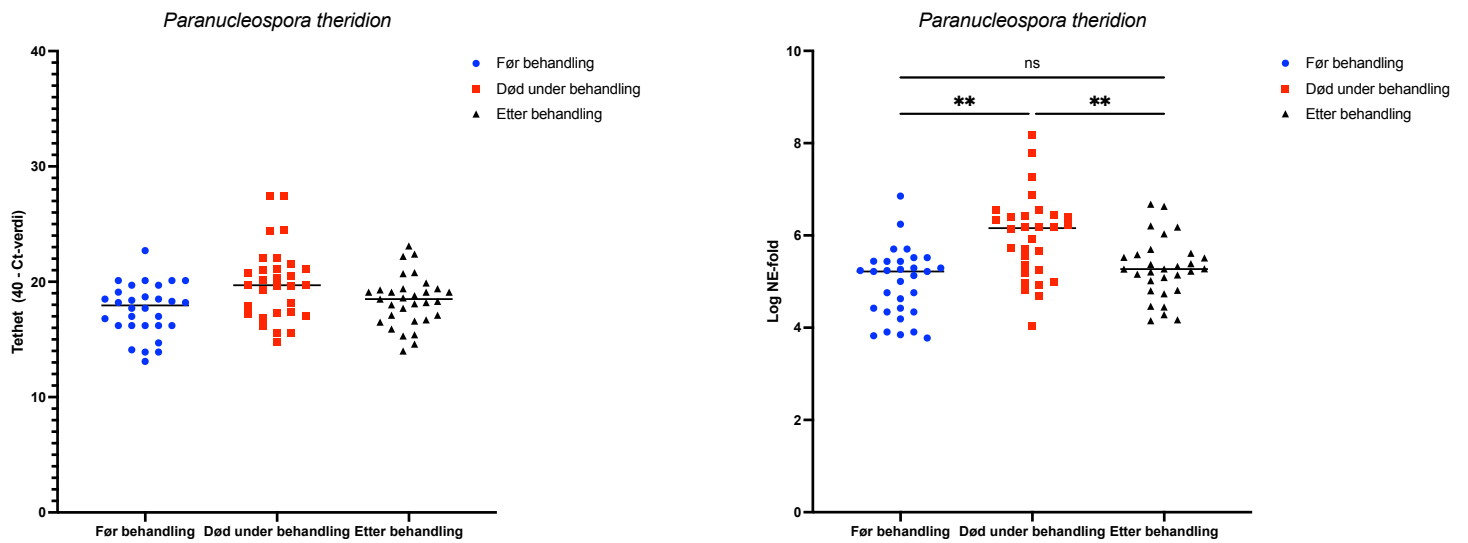
Figur 3.26. Tetthet av PMCV i hjertet hos laks fra anlegg LB i prøveuttaket «død under behandling». Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet. N = 30.

Paranucleospora theridion (Nuc)

Prevalensen for *Paranucleospora theridion* var 100 % for alle tre uttakene. Det er lite forskjeller i tettheten mellom gruppene. I gjellene er det ingen signifikante forskjeller (figur 3.27). Tettheten avtar litt for gruppen «etter behandling». I nyrene kan man se størst tetthet i gruppen «under behandling» (Figur 3.28).



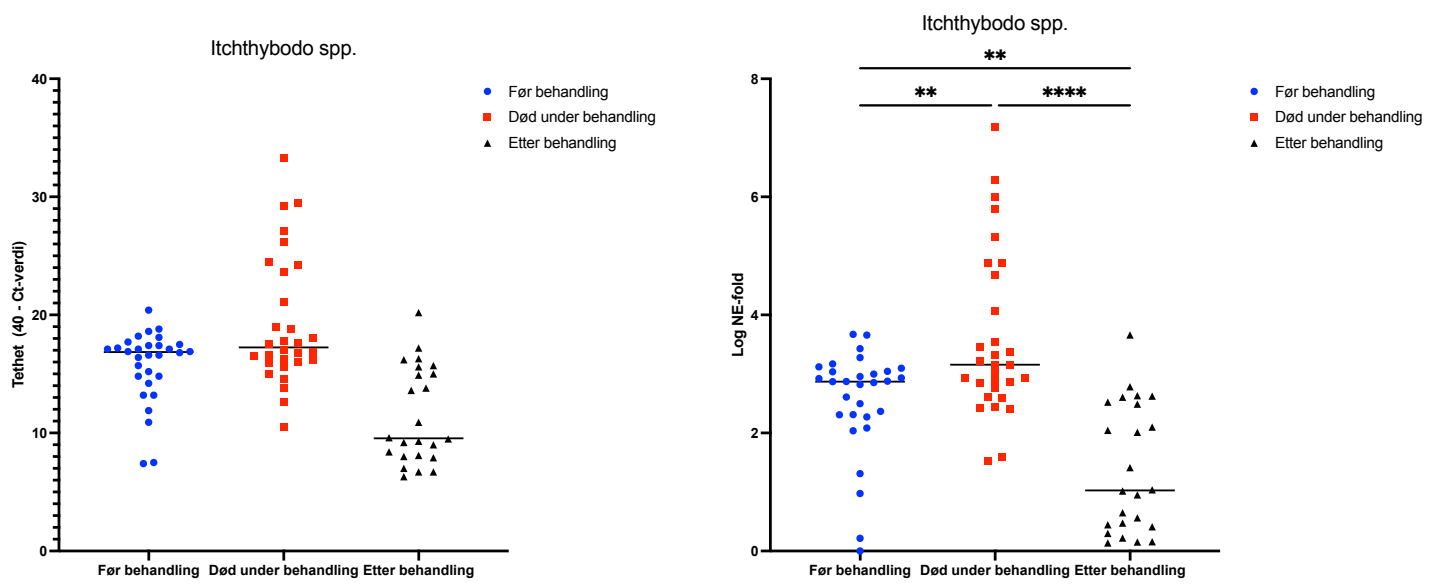
Figur 3.27 Tetthet av *Paranucleospora theridion* i gjelle hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». Ns = no significance.



Figur 3.28. Tetthet av *Paranucleospora theridion* i nyrene hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». ** P ≤ 0.01, Ns = no significance.

Ichthyobodo spp. (Costia)

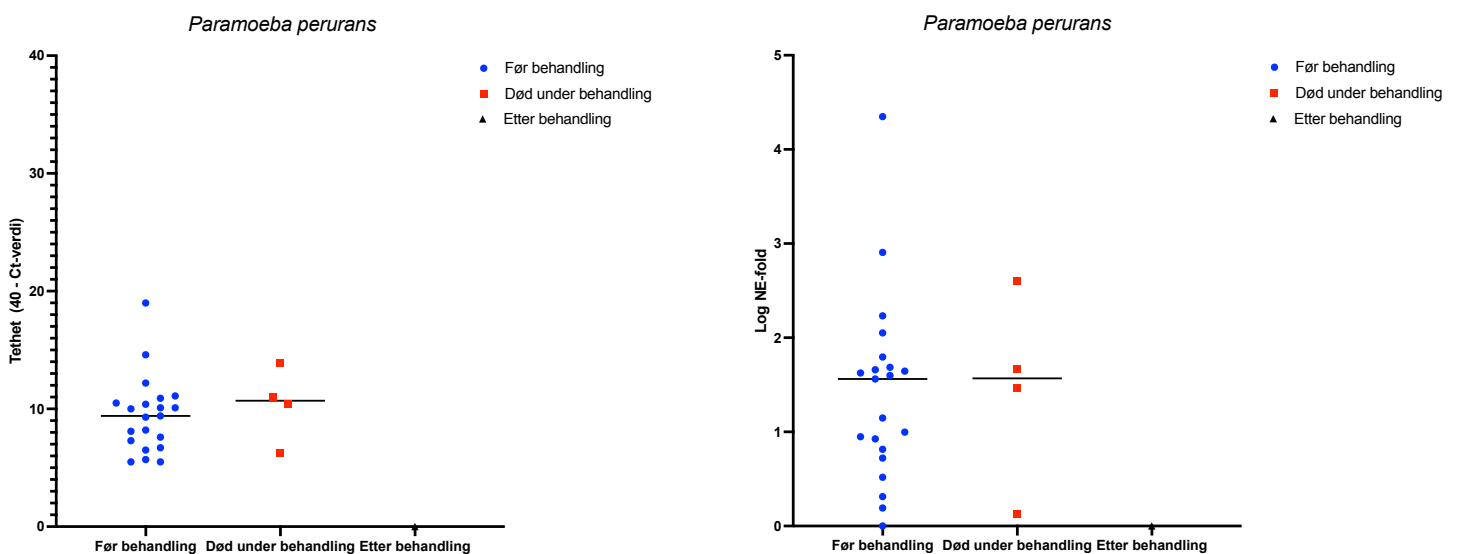
Prevalensen for *Ichthyobodo* spp. (Costia) på gjellene var 100 % for gruppene «før behandling» og «død under behandling». Prevalensen i gruppen «etter behandling» var 74,2 %. Det er en signifikant forskjell i tetthet mellom «etter behandling» og de to foregående gruppene (Figur 3.29). Noen individer i gruppen «død under behandling» kan ses med signifikant høye reverse Ct-verdier og NE-fold-verdier.



Figur 3.29. Tetthet av *Ichthybodo spp.* i gjellevev hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». ** $P \leq 0.01$ og **** $P \leq 0.0001$.

Paramoeba perurans

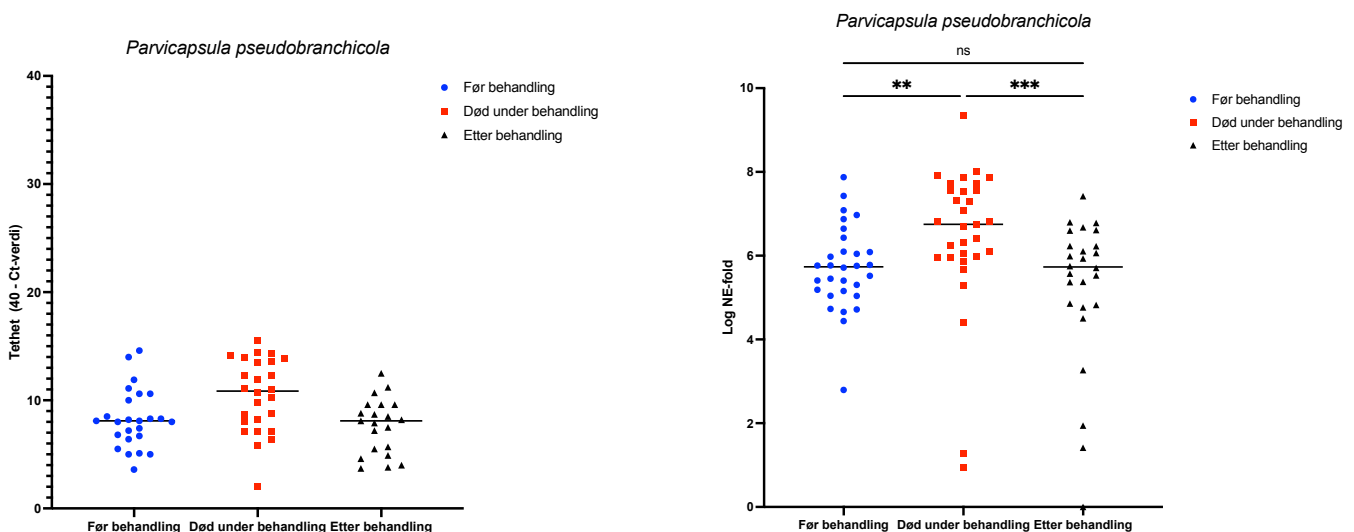
Prevalensen for *P. perurans* var lav. Det var ingen positive individer i gruppen «etter behandling».



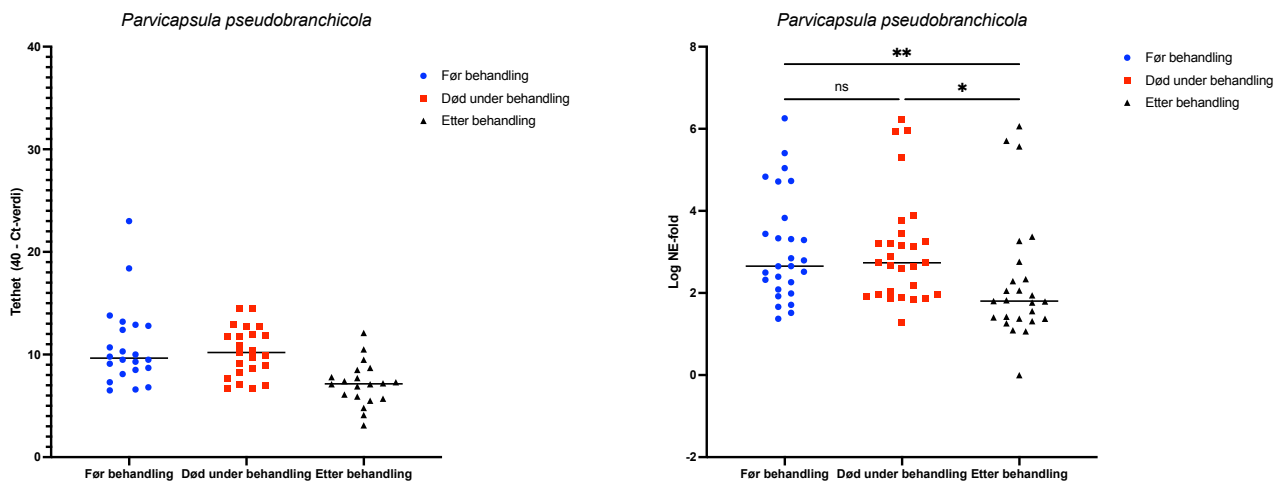
Figur 3.30. Tetthet av *P. perurans* i gjellevev hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - \text{Ct-verdien}$) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling».

Parvicapsula pseudobranchicola

Prevalensen av *Parvicapsula pseudobranchicola* lå på henholdsvis 73,3 %, 76,7 % og 61,3 % for uttakene «før behandling», «under behandling» og «etter behandling». Den laveste Ct-verdien for alle analysene for *Parvicapsula pseudobranchicola* var på 17,0 i gjellevev i gruppen «før behandling» (figur 3.31). Gruppen med den laveste tettheten var «etter behandling» i gjellevev. Resultatet for nyrevevet viser signifikante forskjeller mellom uttakene «før behandling» og «etter behandling» sammenlignet med «død under behandling». Tettheten er høyest for uttaket «død under behandling» (figur 3.32).



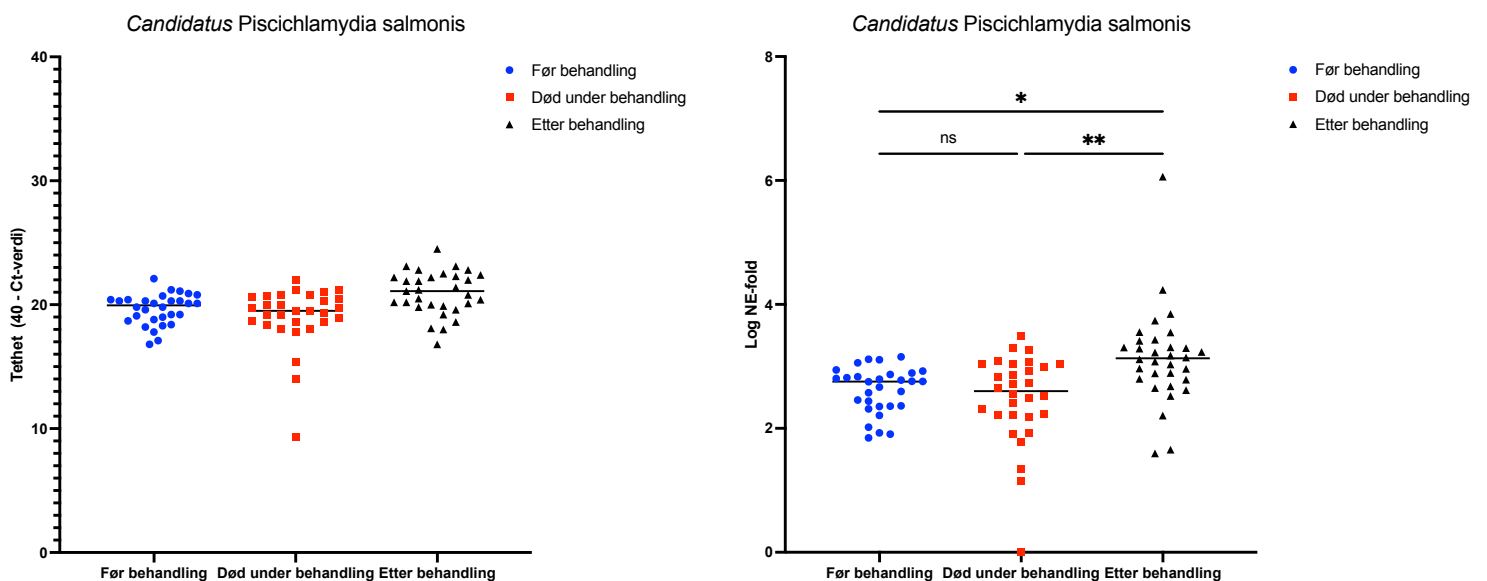
Figur 3.31. Tetthet av *Parvicapsula pseudobranchicola* i gjellevev hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - \text{Ct-verdien}$) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$, ns = no significance.



Figur 3.32. Tetthet av *Parvicapsula pseudobranchicola* i nyrevev hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - Ct$ -verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. $N = 30$ for gruppene «før behandling» og «død under behandling». $N = 31$ for «etter behandling». * $P \leq 0.05$ og ** $P \leq 0.01$, ns = no significance.

Candidatus Piscichlamydia salmonis Pch

Prevalensen av *Cand. Piscichlamydia salmonis* er 100 % i gjellevev for de tre prøveuttakene. Det er lite endringer i tetthet mellom før, under og etter behandling. Tettheten er litt høyere for gruppen «etter behandling», sammenlignet med de to foregående prøveuttakene (figur 3.33).

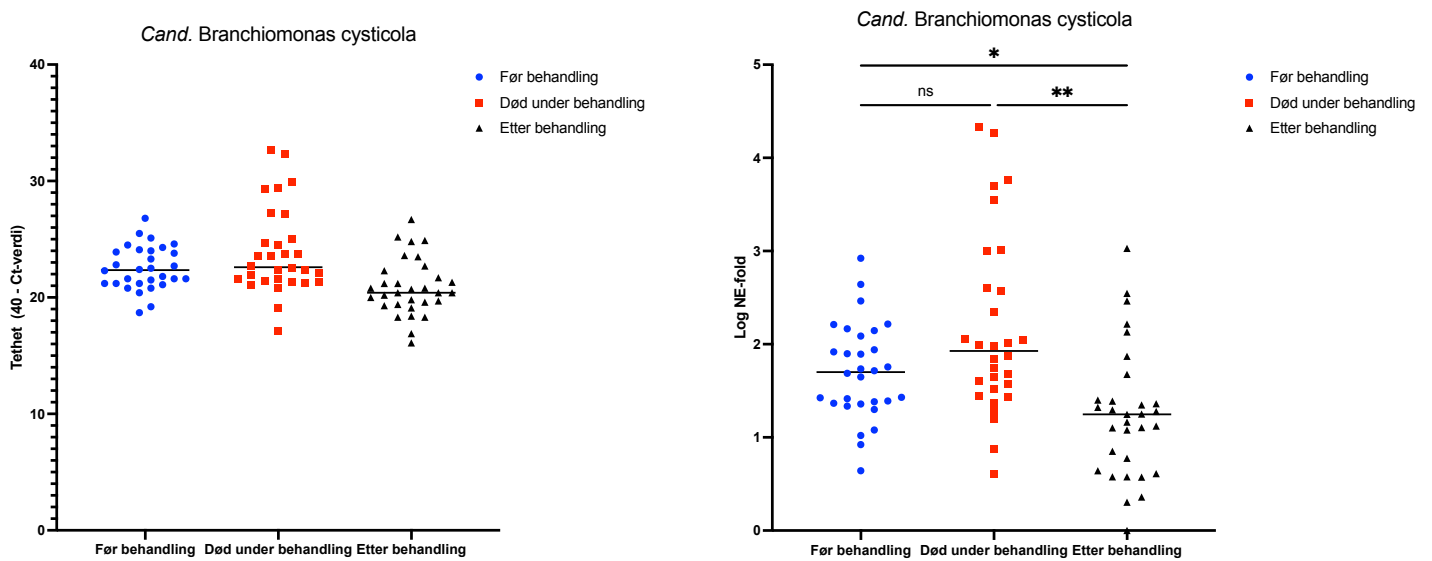


Figur 3.33. Tetthet av *Candidatus Piscichlamydia salmonis* i gjellevev hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi ($40 - Ct$ -verdien)

– Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». * $P \leq 0.05$ og ** $P \leq 0.01$.

Candidatus Branchiomonas cysticola

Prevalensen av *Cand. Piscichlamydia salmonis* er 100 % i gjellevev for de tre prøveuttakene. Tettheten er litt høyere for gruppen «død under behandling», sammenlignet med de to andre prøveuttakene (figur 3.34). Tettheten er lavest «etter behandling».



Figur 3.34. Tetthet av *Candidatus Branchiomonas cysticola* i gjellevev hos laks fra anlegg LB. Hvert punkt representerer en individuell fisk. Dataene er presentert som reversert Ct-verdi (40 – Ct-verdien) og Log NE-fold. Den sorte linjen er gjennomsnittet for hver gruppe. N = 30 for gruppene «før behandling» og «død under behandling». N = 31 for «etter behandling». * $P \leq 0.05$ og ** $P \leq 0.01$, ns = no significance.

4. Diskusjon

Lakselus, og bekjempelsen av den, utgjør i dag en del av den stadig økende produksjonskostnad i norsk oppdrett (Ruggesaeter et al., n.d.). I tillegg til den direkte kostnaden ved behandlingen, er sulting av fisken, behandlingsdødelighet og nedklassing av filetkvalitet indirekte kostnader knyttet til lakselus-behandling (Sandvaer et al., 2018). Det er mange ulike behandlingsmetoder mot lakselus, og oppdretter må ta en vurdering med bakgrunn på effektivitet, fiskevelferd, årstid, fiskens størrelse og infeksjonspress (Grefsrud et al., n.d.; Nilsson et al., 2023; Overton et al., 2019; Poppe et al., 2018). I dette studiet ble effekten termisk behandling av laks holdt i fire timer i kjølt ferskvann, i storskala produksjon, vurdert med fokus på gjellehelse.

Studier som har sett på termisk avlusning har konkludert forskjellig og det er behov for mer kunnskap om denne typen behandling. Vurderingene av de to avlusningene som ble gjennomført i dette studiet er basert på vurdering av ytre skader på fisk, makroskopisk gjellescore, histo-score av gjeller, patogenbelastning (basert på uttrykk av RNA fra utvalgte mikroparasitter), appetitt etter behandling, og vekst i en kort periode etter behandling.

Målet med oppgaven er å dokumentere effekten av denne type mekanisk avlusing (av laks fra kjølt ferskvann) for å se om den har mindre negativ innvirkning på gjellehelse og dermed fiskevelferd i forhold tidligere tilnærminger til termisk behandling. Det ble gjennomført to behandlinger, en i juni og en i august. Fisken som ble behandlet i anlegg GB ble senere flyttet til LB. Det er med andre ord den samme fisken som ble behandlet i begge anleggene.

I en risikorapport fra Havforskningsinstituttet vises det til resultater som tyder på at termiske behandlinger bør unngås ved temperaturer over 13°C (Grefsrud et al., 2018.). I en tiltaksveileder publisert av Sjømat Norge på Lusedata.no anbefales det å veksle mellom avlusningsmetoder etter årstid og temperatur. I tiltaksveilederen anbefales annen mekanisk avlusning som behandlingsmetode ved høye sjøtemperaturer, mens termiske avlusningsmetoder er å foretrekke om vinter/vår/tidlig sommer. Det behov for mer forskning på bruk av termisk behandling av laks ifølge Nygaard et al. (2020). Nygaard et al. peker på at det har vært høyere dødelighet som følge av medisinfrie behandlingsmetoder enn ved bruk av legemidler og skriver at konsekvensene blant annet er stress og ytre skader. Folkedal et al., (2021) utførte en studie hvor de så på effekten av bedøvelse av fisken før termisk avlusning, og

fant at fisken hadde lite atferd som indikerte ubehag, få skader som følge av stress og kollisjoner, god appetitt og lav dødelighet.

I mitt studium ble behandlingen i anlegg GB ble gjennomført tidlig i juni ved en temperatur i havet på 9 °C og med en behandlingstemperatur 28,5 °C etter at laksen ble holdt i kjølt ferskvann ved 6,5 °C, mens behandlingen i anlegg LB (ved en sjøtemperatur på 15 °C) ble gjennomført i slutten av august med en behandlingstemperatur på 28 °C etter at fisk først ble holdt i kjølt ferskvann (6 °C). I kontrast til tidligere studier var dødeligheten i mitt studium ikke høyere enn forventet dødelighet etter medikamentell behandling. Det ble heller ikke oppdaget betydelige mekaniske skader, men histologien avdekket mange ferske aneurismer på noen individer etter behandlingen (se del om histologi). Til tross for anbefalingene om å ikke behandle ved høye temperaturer, ble denne studien gjennomført med gode resultater i september ved relativt høye sjøtemperaturer. Dødeligheten som følge av den termiske avlusningen var lav (figur 3.4 og 3.18), selv med høye sjøtemperaturer (figur 3.1 og 3.15) og en relativ høy tetthet av enkelte makro- og mikroparasitter (PRV1, PMCV, *P. theridion*, *Cand. B. cysticola*) i og på fisken.

En studie om sår og skader etter termisk behandling peker på en sammenheng mellom fiskens lengde og blødninger, sannsynlig fordi en større fisk trolig vil kunne skade seg selv ved stress og trenging (Winger, 2020). En annen studie kom frem til samme korrelasjon, men fant i tillegg epidermal erosjon, gjelleblødninger og gjellenekroser etter termisk behandling (Jørgensen & Rød, 2019) Studien til Moltumyr et al., (2021) fant at laks eksponert for sjøvann som holdt 34 °C i 30 sekunder hadde få signifikante lesjoner foruten finneskader, og konkluderte med at disse sannsynligvis var forårsaket av stress og kollisjoner ved eksponering for varmt vann. Det er ikke foretatt en inngående evaluering av status til hud, men det er registrert lakselus og sårproblematikk både før og etter behandling, samt hos laks som døde under behandlingen. I dette studiet ble det observert enkelte fisk med sår etter lakselus og mekaniske sår, epidermale blødninger (figur 3.5 og 3.6). De siste er sannsynligvis et resultat av trenging og håndtering i forbindelse med behandlingen.

Grøntvedt et al., (2015) utførte en studie for å dokumentere og vurderer effekten av termisk avlusning. Studiens mål var å måle effekten av avlusningen opp mot fiskevelferden. De fant at termisk avlusning fjernet 75-100 % av mobile lus. De så også betydelig dødelighetsrate i anlegg hvor det var påvist gjellesykdom. De lave dødelighetstallene i begge anlegg i mitt studium kan

sannsynligvis delvis forklares av god gjellehelse basert på histologiske undersøkelser av gjellene. Kartlegging og evaluering av gjellestatus og sykdom i forkant av behandling vil derfor være viktig før behandling startes opp. I en studie av Nilsson et al., (2023) fant de at termisk avlusning ved 28-30 °C ikke fjernet 100% av alle preadulte og adulte lus, selv ikke ved eksponering i 120 sekunder, men de fant at de fleste lus slapp taket innen 30 sekunder. De peker også på at lavere behandlingstemperaturer burde kompenseres med lengre eksponeringstid.

Lakselusens infeksjonstrykk varierer med energitilgjengeligheten, alder og temperatur (Dalvin et al., 2020; Hamre et al., 2019b; Samsing et al., 2016). Skern-Mauritzen et al., (2020) så i sin studie at infeksjonsraten økte med temperaturen når sjøtemperaturen er mellom 6 og 15 °C. Ved 15 °C var infeksjonsraten nesten tre ganger så høy som ved 5 °C. Samsing et al., (2016) viste at klekkeraten for lakselusegg var $87 \% \pm 3 \%$ i vann som holder 10 °C og 100 % ved 15-20 °C. I mitt studium var det reduksjon av lakselus etter begge behandlingene. Lusetallet for anlegg GB viste reduksjon i antall bevegelige stadier etter behandling og vedvarende lavt lusetall i ukene etterpå (Figur 3.2). For anlegg LB var det en kraftig reduksjon rett etter behandling, men lusetallet gikk deretter, i løpet av 14 dager, tilbake til nivået før behandling. Ved begge behandlingene ses en signifikant minking i antall bevegelige lus etter behandling. Sjøtemperaturer kan forklare økningen i antall bevegelige stadier av lakselus etter behandling i anlegg LB. Behandlingen dreper ikke lus som er i fastsittende stadier og disse vil ved høy sjøtemperatur raskt nå preadulte stadier. Behandlingen foregikk også merd for merd, noe som kan forklare deler av lusepåslaget. Lusen som falt av fisken under behandling, og som ikke ble fanget opp under avlusing, kan ha blitt overført til nabomerder. Behandlingsvannet ble filtrert og håndtert for å hindre at lusen ble gjeninnført til anleggene, men det er uvisst hvor effektiv slik filtrering er.

I dette prosjektet ble et forenklet scoringssystem brukt til histologisk analyse. Metoden tar for seg fem primære lameller på andre gjellebue. Metoden omfatter en liten del av gjellene, og dette kan være med på å gi et forenklet bilde av gjellenes tilstand. Ved å score hele gjellen kunne resultatet blitt et annet, men på grunn av begrenset tid ble kun fem primærlameller undersøkt. Hvilke fem lameller som ble analysert ble valgt på bakgrunn av tilstand og snittkvalitet, men burde vært randomisert for å sikre en mest mulig objektiv vurdering av gjelletilstanden. Valg av primærlameller for histo-score er derfor til en viss grad subjektive. For å minske grad av uoverensstemmelse i vurderingene, er det samme person som vurderte de 120 snittene. Scoringen kunne og vært utført over et kortere tidsrom med tilfeldig valg av slides for sikrere

en mer objektiv vurdering (dette ble ikke gjort). Gjellesnitt kan være vanskelig å score på grunn av prepareringen. Det var i noen tilfeller vanskeligheter med å skille patologi og artefakter. Dette kan påvirke hvorvidt man kan finne endringer før og etter behandling. Enkelte snitt var svært preget av artefakter, noe som gjorde scoringen utfordrende. I disse tilfellene ble de fem minst pregede lamellene valgt.

Basert på histologisk analyse kan det se ut til at behandlingen ikke påvirket gjellescoren negativt. Resultatet av histologisk analyse viser at de fleste parameterne har lavere gjennomsnittsscore etter behandling. I anlegg GB kan man se at den gjennomsnittlige scoren for parameterne «klubbing», «lifting», «epitelcellehypertrofi», «epitelcellehyperplasi» og «fortykket distal filament» er lavere. Det eneste parameteret som har en høyere score etter gjennomført behandling er «slimcellehyperplasi».

Basert på den histologiske analysen av fisken i LB kan det se ut som om behandlingen har påvirket gjellene i noen grad. Noen av parameterne har en høyere score etter behandlingen. Dette gjelder parameterne «slimcellehypertrofi», «lifting», «epitelcellehypertrofi» og «epitelcellehyperplasi». Den gjennomsnittlige scoringen for alle parametere er høyere i anlegg LB enn i anlegg GB.

Den høye prevalensen for gjellepatogener, kombinert med mangelen på tilsvarende gjellepatologi, samsvarer ikke med tidligere funn (Lyng, 2021; Mitchell et al., 2013; S. Nylund et al., 2011; Steinum et al., 2010). En forklaring kan være at patologien var flekkvis på gjellene og derfor ikke har blitt observert. Oppsummert var det lite samsvar/korrelasjon mellom dødelighet, makroskopisk gjellescore og prevalens for patogener. Ved histologiske analyse fant man enkelte fisk med mange ferske aneurismer to uker etter behandling. Disse kan være et resultat av mekanisk stress, dvs. kanskje et resultat av pumping/heving av fisken ved hjelp av undertrykk. Brønnbåter har ulike prosedyrer, pumpeystem og brønnforhold. Det kan være vanskelig å skille mellom hvilke skader og sår som er forårsaket av trenging og pumping versus termisk behandling. I en rapport fra SINTEF så de på effekten undertrykksendringer hadde på laksens atferd, oppdrift og luftslipp i forbindelse med rørtransport under håndtering. I forsøket utsatte de fisken for undertrykk som tilsvarer et løft på 7-8 meter på 2,5-3,5 sekunder og utførte deretter obduksjon. Ved makroskopisk obduksjon av fiskens svømmeblære fant de ingen tegn til skade (Schrøder et al., 2022). I et annet studium med ferskvannsbehandling mot *P. perurans* ble det observert alvorlige blødninger og aneurismer etter pumping av fisken til ferskvann og tilbake til sjø (Gjerde, 2023). Her ble fisken ikke utsatt for termisk behandling, kun trenging og

pumping. Fremtidige studier bør se på effekten av undertrykk på laksens gjeller i forbindelse med transport av fisk i rørsystemer.

Det kan antas at fisken opplever stress som følge av håndtering, trenging og eksponering for varmt vann (Poppe et al., 2018). Intensiteten av behandling og håndtering i norsk oppdrett stresser fisken og påvirker dens immunsystem (Nardocci et al., 2014) Stress over en lang periode kan forårsake en tilstand av kronisk stress, som kan inhibere immunsystemet til beinfisker (Nardocci et al., 2014). I en studie av Fast et al., (2008), så de på korttids- (15 sekunder håndtering én gang) og langtidseffekten (15 sekunder håndtering hver dag over 4 uker) av stress hos atlantisk laks. Stresset ble kvantifisert gjennom måling av kortison. Resultatene viste at det var ingen signifikant endring hos fisken i noen av gruppene. Fisken som ble utsatt for stress over fire uker hadde nivåer tilsvarende kontrollgruppen. I mitt studium ble ikke stressresponsen til fisken målt, men man kan anta at appetitt og vekst gir en indikasjon. Ved kronisk stress ville man kanskje kunne observert en stagnering i vekst, men i kontrast til dette så man at fisken raskt gjenopptok appetitt i begge anleggene. Dette kan være et resultat av nedkjøling i ferskvann fulgt av en lavere makstemperatur ($\Delta 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) i forbindelse med termisk behandling. I videre studier burde stress tas med som en faktor for å vurdere fiskevelferden i forbindelse med termisk avlusning.

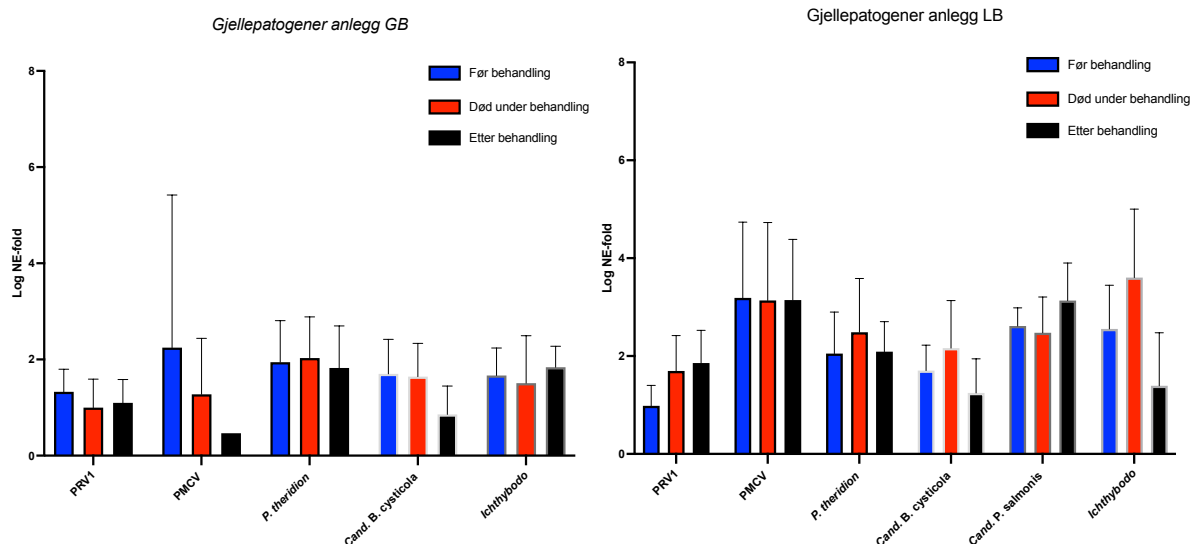
Termisk avlusning har som mål å varmesjokke lakselusen slik at den paralyseres og mister grepet om verten. Dette gjøres ved eksponering i vann som holder en temperatur verken lusen eller laksen er vant til eller tilpasset. Laksens preferanse er vanntemperaturer under $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Oppedal et al., 2011). Poppe et al., (2018) skrev i Norsk Veterinærtidsskrift at det hjelper lite å gjøre det man kan for å minske stresset og trengingen ved behandling dersom fisken likevel utsettes for smerte ved varmtvannsbehandling. Laksen eksponeres for vann som er så varmt at det kan stimulere nosiseptive nervefibre og det oppleves som smerte (Poppe et al., 2018). En studie av Nilsson et al., (2019) konkluderte de med at laks som ble holdt i vann over $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ var tydelig aversive til eksponeringen innen noen sekunder. Studien baserte seg på adferdsendringer, og de så at laksen viste atferd som samsvarer med smerterespons. I mangel på ansiktsuttrykk og lyder, ble svømmeatferd brukt som et mål på ubehag og fisken som ble utsatt for temperaturer over $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ opprettholdt høy svømmeatferd, og kolliderte med vegger og vannoverflaten før de mistet bevisstheten, likevekten og døde.

Dødeligheten kan være en indikator på den generelle fiskevelferden i et anlegg. I 2018 døde 16,8 % av atlantisk laks i norsk oppdrett (B. B. Jensen et al., 2020). Veterinærinstituttets

statistikk viser at 8,4 % av den totale lakseproduksjonen i 2022 døde i forbindelse med håndtering og sykdomsbekjempelse. I en artikkel publisert 08. juli 2022 skriver Veterinærinstituttet at 20 % av dødeligheten blant laks i oppdrett er et direkte resultat av avlusning (*MortMonitor - Veterinærinstituttet*, n.d.). De peker spesielt på metoder innen medikamentfri behandling som benytter høy grad av håndtering, spyling og varmt vann (termisk avlusning). I kontrast til denne statistikken var det lav dødelighet på begge anlegg i forbindelse med behandlingen med henholdsvis 0,01 % og 0,08 % for anlegg GB og LB. En faktor som delvis kan forklare dette er at fisken som ble behandlet hadde generelt en god gjellehelse. Makroskopisk gjellescoring av begge anlegg i felt viste enkelte score 1 og 2, men de fleste fisk ble scoret til 0 på alle gjellebuer.

Det antas at spiseadferd reflekterer den indre tilstanden til laksen og er en viktig parameter for å måle stressresponsen etter behandling (Folkedal, Stien, et al., 2012). Ved tradisjonell termisk behandling (34 °C) har man sett at fisken har avstått fra å spise opp til en uke etter behandlingen (Are Nylund pers. kom). I en studie av Walde et al., (2022) sammenlignet de ulike behandlinger med hensyn til spiseatferd og vektøkning, og fant at termisk behandling hadde dårligst vekst i påfølgende syv dager etter behandling. I mitt studium ble dødelighetsdata og oversikt over utføring i perioden før og etter behandling tilsendt fra oppdretter for å kunne gi en generell indikasjon på fiskevelferden i tiden etter behandlingen. Fôringen av anlegg LB og GB startet opp igjen dagen etter behandlingsdagen. De etter behandling foret de ut henholdsvis 55,7 % og 40,5 % av nivået før behandling. Fiskens K-faktor ble ikke nevneverdig påvirket av behandlingen. En forklaring på dette kan være et resultat av at oppholdet i nedkjølt ferskvann fulgt av termisk avlusning i 28 °C ikke stresser fisken i lik grad som det er konkludert med i andre studier omhandlende termisk avlusning (Gismervik et al., 2019; Sviland Walde et al., 2021; Walde et al., 2022).

Økt dødelighet under og etter behandlingen kan være et resultat av en patogenbelastning. Det ble funnet en rekke patogener i nyre- og gjellevev på laks ved begge lokalitetene. Patogenene som ble funnet med høy prevalens i gjellene var *Piscine orthoreovirus (PRVI)*, *Piscine myocarditis virus (PMCV)*, *Paranucleospora theridion*, *Ichthyobodo salmonis*, *Candidatus Branchiomonas cysticola* og *Candidatus Piscichlamydia salmonis* (tabell 3.1 og 3.2).



Figur 4.1. Tettheten av påviste gjellepatogener fra de to anleggene. Grafen viser tettheten av gitte patogener før og etter behandling, samt hos dødfisk. Dataene er Log-transformert og vises som Log NE-fold med standardavvik (SD). N = 30 for alle uttak unntatt LB og GB «etter behandling», med henholdsvis N = 31 og N = 32.

Kvåle, 2020 fant i sin studie ingen signifikante endringer i patogenbelastning eller histopatologiske endringer som et resultat av termisk avlusning, men knytter dødeligheten etter behandlingen til status på gjellehelsen og patogenbelastningen. Østevik et al., (2022) observerte i sin studie en økning i gjellelesjoner og prevalens av gjellepatogener etter termisk behandling, samt økt gen uttrykk av gener assosiert med cellostress, inflammasjon og proliferasjon av gjellevev. Gjellepatogener som økte i prevalens var *Paramoeba perurans*, *Candidatus Branchiomonas cysticola*, *Paranucleospora theridion* og SGPV. I en studie av Gunnarsson et al., (2017) konkluderte de med at høy tetthet av *P. theridion* sammenfaller med gjellesykdom. De hevder parasitten kan være et hovedagens innen gjellesykdom. Trenden for fisken i anlegg GB er lavere patogenbelastning i etterkant av behandling. En forklaring på dette kan være at god gjellehelse gjør fisken mer robust i møte med fire timer i kjølt ferskvann fulgt av termisk avlusning.

PRV1 ses med økt tetthet i anlegg LB hos dødfisk og etter behandling, sammenlignet med før behandlingen (Figur 4.1). Veterinærinstituttet skriver at HSMB ofte påvises ved funn av store mengde PRV1 i hjertet, samt histologiske funn av betennelse i hjertet (*Hjarte Og Skjelettmuskelbetennelse (HSMB)*, n.d.). Hjertet ble ikke analysert med real time RT-PCR for PRV1. Ved histologisk analyse av hjertet ble det observert fokale nekroser og betennelse i atriet hos dødfisken i anlegg LB, men det var ikke mistanke om HSMB. I en studie av Oliveira et al., (2021) peker de på at oppdrettsanlegg i sone 2-4 gjennomgår flere avlusninger og har høyere

dødelighet på fisk som følge av CMS. Studien til Bang Jensen et al., (2020) konkluderer med at patogenbelastet fisk som gjennomgår termisk avlusning har økt dødelighet og fare for utvikling av CMS. Anlegg med utbrudd av CMS har høy prevalens av PMCV sammenlignet med anlegg som ikke utviklet CMS (Svendsen et al., 2019). Det var signifikante endringer i mellom anlegg BG og LB i tetthet av PMCV. Det er vist at infeksjon med PMCV kan utvikle seg til CMS i løpet av 6,5 måneder (Fritsvold et al., 2021; Garseth et al., 2018; Wiik-Nielsen et al., 2016). Det samsvarer med resultatene i mitt studium, hvor en ser at fisken mellom uttakene i juni og august fikk økt tetthet og prevalens for PMCV, og utviklet CMS i løpet av høsten 2022. Fisken som døde i anlegg LB hadde mye virusarvestoff i hjertet (figur 3.26), samt histopatologiske funn av betennelse og nekrose i atriet, så en forklaring på dødeligheten kan være at fisken som døde hadde et affisert hjerte og dermed ikke tålte behandlingen og stresset det påførte fisken. Derfor kan tilstedeværelse av PMCV og dets potensiale for utvikling til CMS være noe å ta i betraktning ved gjennomføring av behandling.

5. Konklusjon og videre arbeid

Studiumet mitt viste at hvis det foreligger god gjellehelse, vil laks holdt i fire timer i nedkjølt ferskvann (6-6,5 °C) fulgt av termisk avlusning (28-28,5 °C), ha få endringer i gjellevev og patogenbelastning og lav dødelighet. Behandlingen hadde god effekt på fastsittende lus og det var få histopatologiske endringer på gjellene mellom fisken som ble behandlet i anlegg GB og LB. Fisken som døde i anlegg LB hadde høyere tetthet av PMCV. Fiskens K-faktor ble ikke negativt påvirket som følge av behandlingene og det var kun enkelte fisk med epidermale blødninger.

Basert på funn i denne studien kan det være lurt å vurdere fiskens gjellehelse og patogenbelastning i forkant av behandlingen. PMCV-belastet fisk som gjennomgår termisk behandling, kan basert på denne studien og andre studier, få økt dødelighet som følge av utvikling av CMS ved et senere tidspunkt. Studier tyder på at termisk behandling kan føre til en økning i CMS dødelighet. Det kan derfor være hensiktsmessig å belastningsbegrense fisken så godt det lar seg gjøre for å unngå at sykdom utvikler seg.

Referanser

- Abolofia, J., & Wilen, J. E. (2017). *The Cost of Lice: Quantifying the Impacts of Parasitic Sea Lice on Farmed Salmon*. <https://doi.org/10.1086/691981>
- Abolofia, J., Wilen, J. E., & Asche, F. (2017). The cost of lice: Quantifying the impacts of parasitic sea lice on farmed salmon. *Marine Resource Economics*, 32(3), 329–349. <https://doi.org/10.1086/691981>
- Asche, F., Guttormsen, A. G., & Tveterås, R. (1999). Environmental problems, productivity and innovations in Norwegian salmon aquaculture. *Aquaculture Economics and Management*, 3(1), 19–29. <https://doi.org/10.1080/13657309909380230>
- Bang Jensen, B., Mårtensson, A., & Kristoffersen, A. B. (2020). Estimating risk factors for the daily risk of developing clinical cardiomyopathy syndrome (CMS) on a fishgroup level. *Preventive Veterinary Medicine*, 175, 104852. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2019.104852>
- Bricknell, I., Dalesman, S., O’Shea, B., ... C. P.-D. of aquatic, & 2006, U. (2006). Effect of environmental salinity on sea lice *Lepeophtheirus salmonis* settlement success. *Int-Res.Com*. <https://www.int-res.com/abstracts/dao/v71/n3/p201-212/>
- Clinton, M., Wyness, A. J., Martin, S. A. M., Brierley, A. S., & Ferrier, D. E. K. (2021). Sampling the fish gill microbiome: a comparison of tissue biopsies and swabs. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02374-0/TABLES/1>
- Connors, B. M., Juarez-Colunga, E., & Dill, L. M. (2008). Effects of varying salinities on *Lepeophtheirus salmonis* survival on juvenile pink and chum salmon. *Journal of Fish Biology*, 72(7), 1825–1830. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2008.01839.X>
- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22(10), 475–483. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2006.08.006>
- Costello, M. J. (2009). How sea lice from salmon farms may cause wild salmonid declines in Europe and North America and be a threat to fishes elsewhere. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1672), 3385–3394. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2009.0771>
- Dalvin, S., Are Hamre, L., Skern-Mauritzen, R., Vågseth, T., Stien, L., Oppedal, F., & Bui, S. (2020). The effect of temperature on ability of *Lepeophtheirus salmonis* to infect and persist on Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases*, 43(12), 1519–1529. <https://doi.org/10.1111/JFD.13253>

- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85(1), 97–177. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00050.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0010503440040.JPEG>
- Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., & Afonso, L. O. B. (2008). Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(2), 194–204. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2007.10.009>
- Finstad, B., Bjørn, P. A., Grimnes, A., & Hvidsten, N. A. (2000). Laboratory and field investigations of salmon lice [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] infestation on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture Research*, 31(11), 795–803. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2109.2000.00511.X>
- Folkedal, O., Stien, L. H., Torgersen, T., Oppedal, F., Olsen, R. E., Fosseidengen, J. E., Braithwaite, V. A., & Kristiansen, T. S. (2012). Food anticipatory behaviour as an indicator of stress response and recovery in Atlantic salmon post-smolt after exposure to acute temperature fluctuation. *Physiology & Behavior*, 105(2), 350–356. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.08.008>
- Folkedal, O., Torgersen, T., Olsen, R. E., Fernö, A., Nilsson, J., Oppedal, F., Stien, L. H., Kristiansen, T. S., & Fernö, A. (2012). Duration of effects of acute environmental changes on food anticipatory behaviour, feed intake, oxygen consumption, and cortisol release in Atlantic salmon parr. *Physiology & Behavior*, 105(2), 283–291. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.07.015>
- Folkedal, O., Utskot, S. O., & Nilsson, J. (2021). Thermal delousing in anaesthetised small Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts: A case study showing the viability of anaesthesia prior to delousing for improved welfare during treatment for salmon lice. *Animal Welfare*, 30, 117–120. <https://doi.org/10.7120/09627286.30.2.117>
- Freeman, M., & Kristmundsson, Á. (n.d.). *The presence of sporogonic stages of Tetracapsuloides bryosalmonae in Icelandic salmonids detected using in situ hybridisation*. <https://doi.org/10.14411/fp.2021.020>
- Frisch, K., Smage, S. B., Johansen, R., Duesund, H., Brevik, O. J., & Nylund, A. (2018). Pathology of experimentally induced mouthrot caused by *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon smolts. *PLOS ONE*, 13(11), e0206951. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206951>

- Fritsvold, C., Mikalsen, A. B., Poppe, T. T., Taksdal, T., & Sindre, H. (2021). Characterization of an outbreak of cardiomyopathy syndrome (CMS) in young Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, *44*(12), 2067–2082. <https://doi.org/10.1111/JFD.13521>
- Gaasland, I. (2020). Fisk og jordbruk – hvem definerer Norges interesser? *Interessekonflikter i Norsk Handelspolitikk*, 35–58. <https://doi.org/10.18261/9788215050010-2020-04>
- Garseth, H., Fritsvold, C., Svendsen, J. C., Bang Jensen, B., & Mikalsen, A. B. (2018). Cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon *Salmo salar* L.: A review of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, *41*(1), 11–26. <https://doi.org/10.1111/JFD.12735>
- Gismervik, K., Gåsnes, S. K., Gu, J., Stien, L. H., Madaro, A., & Nilsson, J. (2019). Thermal injuries in Atlantic salmon in a pilot laboratory trial. *Veterinary and Animal Science*, *8*, 100081. <https://doi.org/10.1016/J.VAS.2019.100081>
- Gismervik, K., Nielsen, K. V., Lind, M. B., & Viljugrein, H. (2017). Mekanisk avlusing med FLS-avlusersystem- dokumentasjon av fiskevelferd og effekt mot lus. *Veterinærinstituttet*, 43. [file:///Users/annanygardjohansen/Downloads/6-2017 - Mekanisk avlusing - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt mot lus.pdf](file:///Users/annanygardjohansen/Downloads/6-2017%20-%20Mekanisk%20avlusing%20-%20dokumentasjon%20av%20fiskevelferd%20og%20effekt%20mot%20lus.pdf)
- Gjerde, O. (2023). *The effects of freshwater treatment and thermal delousing against Amoebic Gill Disease (AGD) and sea lice (L. salmonis and C. elongatus) on the gills of Atlantic salmon (Salmo salar L.), and experimental testing of the virulence of Paramoeba perurans with change in microbiota*. <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/3045583>
- Grefsrud, E. S., Glover, K., Grøsvik, B. E., Husa, V., Karlsen, Ø., Kristiansen, T., Kvamme, B. O., Mortensen, S., Samuelsen, O. B., Stien, L. H., Svåsand, T., Agnalt, A.-L., Albretsen, J., Asplin, L., Bannister, R., Berg, M., Bjørn, P. A., Bolstad, G., Diserud, O., ... Wennevik, V. (n.d.). *Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2018 F I S K E N*.
- Groner, M. L., Laurin, E., Stormoen, M., Sanchez, J., Fast, M. D., & Revie, C. W. (2019). Evaluating the Potential for Sea Lice to Evolve Freshwater Tolerance as a Consequence of Freshwater Treatments in Salmon Aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, *11*, 507–519. <https://doi.org/10.3354/AEI00324>
- Grøntvedt, R., Nerbøvik, I.-K., Viljugrein, H., Lillehaug, A., Nilsen, H., & Gjevre, A.-G. (2015). *Thermal de-licing of salmonid fish - documentation of fish welfare and effect*. https://www.researchgate.net/publication/299487882_Thermal_de-licing_of_salmonid_fish_-_documentation_of_fish_welfare_and_effect
- Gunnarsson, G. S., Karlsbakk, E., Blindheim, S., Plarre, H., Imsland, A. K., Handeland, S., Sveier, H., & Nylund, A. (2017). Temporal changes in infections with some pathogens

- associated with gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture*, *468*, 126–134. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.10.011>
- Guragain, P., Tkachov, M., Båtnes, A. S., Olsen, Y., Winge, P., & Bones, A. M. (2021). Principles and Methods of Counteracting Harmful Salmon–Arthropod Interactions in Salmon Farming: Addressing Possibilities, Limitations, and Future Options. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 965. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.701793/BIBTEX>
- Halttunen, E., Gjelland, K., Hamel, S., Serra-Llinares, R. M., Nilsen, R., Arechavala-Lopez, P., Skarðhamar, J., Johnsen, I. A., Asplin, L., Karlsen, Bjørn, P. A., & Finstad, B. (2018). Sea trout adapt their migratory behaviour in response to high salmon lice concentrations. *Journal of Fish Diseases*, *41*(6), 953–967. <https://doi.org/10.1111/JFD.12749>
- Hamre, L. A., Bui, S., Oppedal, F., Skern-Mauritzen, R., & Dalvin, S. (2019a). Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24°C. *Aquaculture Environment Interactions*, *11*, 429–443. <https://doi.org/10.3354/AEI00320>
- Hamre, L. A., Glover, K. A., & Nilsen, F. (2009). Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837)) laboratory strains. *Parasitology International*, *58*(4), 451–460. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2009.08.009>
- Harðardóttir, H. M., Male, R., Nilsen, F., & Dalvin, S. (2019). Effects of chitin synthesis inhibitor treatment on *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda, Caligidae) larvae. *PloS One*, *14*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0222520>
- Harðardóttir, H. M., Male, R., Nilsen, F., Eichner, C., Dondrup, M., & Dalvin, S. (2021). Chitin synthesis in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, *227*, 123–133. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2018.10.008>
- Heggland, E. I., Tröbse, C., Eichner, C., & Nilsen, F. (2019). Heavy and light chain homologs of ferritin are essential for blood-feeding and egg production of the ectoparasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *232*. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2019.111197>
- Henriksen, A., Lien, L., Rosseland, B., Ambio, T. T., & 1989, undefined. (n.d.). Lake acidification in Norway: present and predicted fish status. *JSTOR*. Retrieved May 25, 2023, from <https://www.jstor.org/stable/4313601>
- Hjarte og skjelettmuskelbetennelse (HSMB)*. (n.d.). Retrieved May 16, 2023, from <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/hjerte-og-skjelettmuskelbetennelse-hsmb>

- Hjeltnes, B., Bang-jensen, B., Bornø, G., Haukaas, A., & Walde, C. S. (2018). *The Health Situation in Norwegian Aquaculture 2018*.
[file:///Users/annanygardjohansen/Downloads/Fish health report 2018 eng-enkeltsider.pdf](file:///Users/annanygardjohansen/Downloads/Fish%20health%20report%202018%20eng-enkeltsider.pdf)
- Hodneland, K., & Endresen, C. (2006). Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, *131*(2), 184–192.
<https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2005.08.012>
- Horsberg, T. E., Hoy, T., & Nafstad, I. (1989). Organophosphate Poisoning of Atlantic Salmon in Connection with Treatment against Salmon Lice. *Acta Vet. Scand*, *30*, 385–390.
- Isaksen, T. E. (2013). *Ichthyobodo infections on farmed and wild fish*.
https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=no&user=ZLbXrvoAAAIAAJ&cstart=20&pagesize=80&sortby=pubdate&citation_for_view=ZLbXrvoAAAIAAJ:Wp0gIr-vW9MC
- Jagoe, C. H. (1988). *A histological and ultrastructural study of the effects of low pH and aluminum upon the gills of the Atlantic salmon*. The University of Maine.
<https://www.proquest.com/docview/303586660?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true>
- Jensen, B. B., Qviller, L., & Toft, N. (2020). Spatio-temporal variations in mortality during the seawater production phase of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Journal of Fish Diseases*, *43*(4), 445–457. <https://doi.org/10.1111/JFD.13142>
- Jensen, E. M., Horsberg, T. E., Sevatdal, S., & Helgesen, K. O. (2020a). Trends in de-lousing of Norwegian farmed salmon from 2000–2019—Consumption of medicines, salmon louse resistance and non-medicinal control methods. *PLOS ONE*, *15*(10), e0240894.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240894>
- Jensen, E. M., Horsberg, T. E., Sevatdal, S., & Helgesen, K. O. (2020b). Trends in de-lousing of Norwegian farmed salmon from 2000–2019—Consumption of medicines, salmon louse resistance and non-medicinal control methods. *PLOS ONE*, *15*(10), e0240894.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240894>
- Jørgensen, L. M., & Rød, I. H. (2019). Temporale makroskopiske og histopatologiske forandringer etter termisk avlusing hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.). 92.
<https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2601456>
- Keeling, S. E., Johnston, C., Wallis, R., Brosnahan, C. L., Gudkovs, N., & McDonald, W. L. (2012). Development and validation of real-time PCR for the detection of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*, *35*(2), 119–125. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2011.01327.X>

- Kvåle, B. L. (2020). *Effekt av termisk avlusing på gjellehelse hos laks: Hos patogenfri laks og i kommersiell produksjon på Vestlandet*. [The University of Bergen]. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Effekt%20av%20termisk%20avlusing%20p%C3%A5%20gjellehelse%20hos%20laks%3A%20Hos%20patogenfri%20laks%20og%20i%20kommersiell%20produksjon%20p%C3%A5%20Vestlandet&publication_year=2020&author=B.L.%20Kv%C3%A5le
- Lokesh, J., & Kiron, V. (2016). Transition from freshwater to seawater reshapes the skin-associated microbiota of Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP19707>
- Lowrey, L., Woodhams, D. C., Tacchi, L., & Salinas, I. (2015). Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community with antifungal properties in the skin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6915–6925. https://doi.org/10.1128/AEM.01826-15/SUPPL_FILE/ZAM999116625SO1.PDF
- Lyng, P. L. (2021). *Paramoeba perurans* and AGD in Norwegian aquaculture: effect of freshwater treatment against AGD on gill health in commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and experimental testing of virulence of *Paramoeba perurans*. <https://bora.uib.no/bora-xmlui/handle/11250/2761223>
- Mitchell, S. O., Baxter, E. J., Holland, C., & Rodger, H. D. (2012). Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*, 20(5), 813–825. <https://doi.org/10.1007/S10499-012-9504-X/FIGURES/3>
- Mitchell, S. O., & Rodger, H. D. (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 34(6), 411–432. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2011.01251.X>
- Mitchell, S. O., Steinum, T. M., Toenshoff, E. R., Kvellestad, A., Falk, K., Horn, M., & Colquhoun, D. J. (2013). ‘*Candidatus Branchiomonas cysticola*’ is a common agent of epitheliocysts in seawater-farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway and Ireland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103(1), 35–43. <https://doi.org/10.3354/DAO02563>
- Moltumyr, L., Gismervik, K., Gu, J., Gåsnes, S. K., Kristiansen, T. S., Rønnestad, I., Nilsson, J., & Stien, L. H. (2021). Does the thermal component of warm water treatment inflict acute lesions on Atlantic salmon (*Salmo salar*)? *Aquaculture*, 532, 736048. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736048>

- MortMonitor* - Veterinærinstituttet. (n.d.). Retrieved May 10, 2023, from <https://www.vetinst.no/forskning-innovasjon/pagaende-forskningsprosjekter/mortmonitor-bedre-forstaelse-og-overvaking-av-dodelighet-i-oppdrettsfisk-for-en-baerekraftig-vekst-i-akvakultur>
- Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P. P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B., Jara, P., Acuña-Castillo, C., & Fernández, R. (2014). Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *40*(2), 531–538. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.08.001>
- Nilsson, J., Barrett, L. T., Mangor-Jensen, A., Nola, V., Harboe, T., & Folkedal, O. (2023). Effect of water temperature and exposure duration on detachment rate of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*); testing the relevant thermal spectrum used for delousing. *Aquaculture*, *562*, 738879. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738879>
- Nilsson, J., Moltumyr, L., Madaro, A., Kristiansen, T. S., Gåsnes, S. K., Mejdell, C. M., Gismervik, K., & Stien, L. H. (2019). Sudden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon. *Veterinary and Animal Science*, *8*, 100076. <https://doi.org/10.1016/J.VAS.2019.100076>
- Nilsson, J., Stien, L., Iversen, M., Kristiansen, T., Torgersen, T., Oppedal, F., Folkedal, O., Hvas, M., Gismervik, S., Ellingsen, K., Nielsen, K., Mejdell, C., Kolarevic, J., Izquierdo-Gomez, D., Sæther, B.-S., Espmark, Å., Midling, K., Roth, B., Turnbull, J., & Noble, C. (2018). Welfare Indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare. *Welfare Indicators for Farmed Atlantic Salmon*, 10–145. <http://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/28435>
- Nygaard, S., Klakegg, B., Markussen, Ø., Horsberg, T. E., Hamadi, M., & Persson, D. (2020). *Tiltaksveileder kontroll med lakselus og skottelus*. <https://lusedata.no/wp-content/uploads/2022/03/2120.01.20-Tiltaksveileder-Lakselus-og-skottelus.pdf>
- Nylund, A., Hansen, H., Brevik, Ø. J., Hustoft, H., Markussen, T., Plarre, H., & Karlsbakk, E. (2018). Infection dynamics and tissue tropism of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporea) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasites & Vectors* *2018 11:1*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2583-9>
- Nylund, A., Karlsbakk, E., Sæther, P. A., Koren, C., Larsen, T., Nielsen, B. D., Brøderud, A. E., Høstlund, C., Fjellsøy, K. R., Lervik, K., & Rosnes, L. (2005). *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxosporea) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Diseases of Aquatic Organisms*, *63*(2–3), 197–204. <https://doi.org/10.3354/DAO063197>

- Nylund, A., Pistone, D., Trösse, C., Blindheim, S., Andersen, L., & Plarre, H. (2018). Genotyping of *Candidatus Syngnamydia salmonis* (chlamydiales; Simkaniaceae) co-cultured in *Paramoeba perurans* (amoebozoa; Paramoebidae). *Archives of Microbiology*, *200*(6), 859–867. <https://doi.org/10.1007/S00203-018-1488-0/TABLES/3>
- Nylund, A., Røed, M., Blindheim, S., Trösse, C., & Andersen, L. (2021). Experimental challenge of Atlantic salmon *Salmo salar* using clones of *Paramoeba perurans*, *P. pemaquidensis* and *Tetramitus* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, *145*, 1–13. <https://doi.org/10.3354/DAO03597>
- Nylund, A., Watanabe, K., Nylund, S., Karlsen, M., Sæther, P. A., Arnesen, C. E., & Karlsbakk, E. (2008). Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives of Virology*, *153*(7), 1299–1309. <https://doi.org/10.1007/S00705-008-0117-7/FIGURES/9>
- Nylund, S., Andersen, L., Sævareid, I., Plarre, H., Watanabe, K., Arnesen, C. E., Karlsbakk, E., & Nylund, A. (2011). Diseases of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* associated with infections by the microsporidian *Paranucleospora theridion*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *94*(1), 41–57. <https://doi.org/10.3354/DAO02313>
- Nylund, S., Nylund, A., Watanabe, K., Arnesen, C. E., & Karlsbakk, E. (2010). *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a Life Cycle in the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *57*(2), 95–114. <https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2009.00451.X>
- Nylund, S., Steigen, A., Karlsbakk, E., Plarre, H., Andersen, L., Karlsen, M., Watanabe, K., & Nylund, A. (2015). Characterization of ‘*Candidatus Syngnamydia salmonis*’ (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Archives of Microbiology*, *197*(1), 17. <https://doi.org/10.1007/S00203-014-1038-3>
- Olafsen, T., Winther, U., Olsen, Y., & Skjermo, J. (2012). *Verdiskaping basert på produktive hav i 2050*. https://scholar.google.com/scholar?q=Verdiskaping%20basert%20p%C3%A5%20produktive%20hav%20i%202050.%20Rapport%20fra%20en%20arbeidsgruppe%20oppnevnt%20av%20Det%20Kongelige%20Norske%20Videnskabers%20Selskab%20%20og%20Norges%20Tekniske%20Vitenskapsakademi#d=gs_cit&t=1684594457469&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3AhxrN_fS-fokJ%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D1%26hl%3Dno

- Olaussen, J. O., & Liu, Y. (2011). On the willingness-to-pay for recreational fishing-escaped farmed versus wild Atlantic salmon. *Aquaculture Economics and Management*, 15(4), 245–261. <https://doi.org/10.1080/13657305.2011.624573>
- Oldham, T., Simensen, B., Trengereid, H., & Oppedal, F. (2023). Environmentally responsive parasite prevention halves salmon louse burden in commercial marine cages. *Aquaculture*, 563, 738902. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738902>
- Oliveira, V. H. S., Dean, K. R., Qviller, L., Kirkeby, C., & Bang Jensen, B. (2021). Factors associated with baseline mortality in Norwegian Atlantic salmon farming. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93874-6>
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. E. O., Nilsen, T. O., & Hordvik, I. (2020). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>
- Oppedal, F., Dempster, T., & Stien, L. H. (2011). Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: A review. *Aquaculture*, 311(1–4), 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.11.020>
- Østevik, L., Stormoen, M., Evensen, Ø., Xu, C., Lie, K. I., Nødtvedt, A., Rodger, H., Skagøy, A., Manji, F., & Alarcón, M. (2022). Effects of thermal and mechanical delousing on gill health of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 552, 738019. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738019>
- Østevik, L., Stormoen, M., Hellberg, H., Kraugerud, M., Manji, F., Lie, K. I., Nødtvedt, A., Rodger, H., & Alarcón, M. (2022). A cohort study of gill infections, gill pathology and gill-related mortality in sea-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): A descriptive analysis. *Journal of Fish Diseases*, 45(9), 1301–1321. <https://doi.org/10.1111/JFD.13662>
- Øvergård, A. C., Hamre, L. A., Grotmol, S., & Nilsen, F. (2018). Salmon louse rhabdoviruses: Impact on louse development and transcription of selected Atlantic salmon immune genes. *Developmental & Comparative Immunology*, 86, 86–95. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2018.04.023>
- Overton, K., Dempster, T., Oppedal, F., Kristiansen, T. S., Gismervik, K., & Stien, L. H. (2019). Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1398–1417. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12299>
- Plarre, H., Devold, M., Snow, M., & Nylund, A. (2005). Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1), 71–79. <https://doi.org/10.3354/DAO066071>

- Poppe, T. T., Dalum, A. S., Røislien, E., Nordgreen, J., & Helgesen, K. O. (2018). Termisk behandling av laks. *Norsk Veterinærtidsskrift* Nr. 3. <https://d178ivhysawugh.cloudfront.net/1523876150/termisk-behandling-av-laks.pdf>
- Powell, M. D., Fisk, D., & Nowak, B. F. (2000). Effects of graded hypoxia on Atlantic salmon infected with amoebic gill disease. *Journal of Fish Biology*, 57(4), 1047–1057. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2000.TB02210.X>
- Powell, M. D., Reynolds, P., & Kristensen, T. (2015). Freshwater treatment of amoebic gill disease and sea-lice in seawater salmon production: Considerations of water chemistry and fish welfare in Norway. *Aquaculture*, 448, 18–28. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2015.05.027>
- Rodger, H. D., Murphy, K., Mitchell, S. O., & Henry, L. (2011). Gill disease in marine farmed Atlantic salmon at four farms in Ireland. *Veterinary Record*, 168(25), 668–668. <https://doi.org/10.1136/VR.D3020>
- Roth, B. (2016). Avlusing av laksefisk med Optilice: Effekt på avlusing og fiskevelferd. 41. <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/handle/11250/3051299>
- Ruggesaeter, A., Martin, K., Haug, V., & Bjørnenak, T. (n.d.). *Kostnad ved behandling av lakselus Et litteratursøk og en modelleringstilnaerming*.
- Samsing, F., Oppedal, F., Dalvin, S., Johnsen, I., Vågseth, T., & Dempster, T. (2016). Salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) development times, body size, and reproductive outputs follow universal models of temperature dependence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73(12), 1841–1851. https://doi.org/10.1139/CJFAS-2016-0050/SUPPL_FILE/CJFAS-2016-0050SUPPL.DOCX
- Sandvaer, F., Thomas, K., & H. (2018). *Kostnader knyttet til behandling mot lakselus i norsk havbruksnæring*. <https://uis.brage.unit.no/uis-xmlui/handle/11250/2566162>
- Schrøder, M. B., Venås, B., Siri Kristine Gåsnes, Gismervik, K., Harasimczuk, E., Rosten, C., Edda, K. J., Volent, Z., Schellewald, C., Caharija, W., Føre, M., Mulelid, M. A., & Bondø, M. (2022). *Teknologiske verktøy for objektiv dokumentasjon av velferd hos laksefisk ved håndteringsoperasjoner (OWITOLS)*. <https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901594/>
- Skern-Mauritzen, R., Sissener, N. H., Sandvik, A. D., Meier, S., Sævik, P. N., Skogen, M. D., Vågseth, T., Dalvin, S., Skern-Mauritzen, M., & Bui, S. (2020). Parasite development affect dispersal dynamics; infectivity, activity and energetic status in cohorts of salmon

- louse copepodids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 530–531, 151429. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2020.151429>
- Solberg, B., Moiseyev, A., Hansen, J. Ø., Horn, S. J., & Øverland, M. (2021). Wood for food: Economic impacts of sustainable use of forest biomass for salmon feed production in Norway. *Forest Policy and Economics*, 122, 102337. <https://doi.org/10.1016/J.FORPOL.2020.102337>
- Statistikk for akvakultur - publikasjon*. (2019). <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Tall-og-analyse/Statistiske-publikasjoner/Statistikk-for-akvakultur>
- Steinum, T., Kvellestad, A., Colquhoun, D. J., Heum, M., Mohammad, S., Nygaard Grøntvedt, R., & Falk, K. (2010). Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91(3), 201–211. <https://doi.org/10.3354/DAO02266>
- Stene, A., Hellevik, C. C., FjØrtoft, H. B., & Philis, G. (2022). Considering elements of natural strategies to control salmon lice infestation in marine cage culture. *Aquaculture Environment Interactions*, 14, 181–188. <https://doi.org/10.3354/AEI00436>
- Stone, J., Boyd, S., ... C. S.-J. of fish, & 2002, undefined. (2002). An evaluation of freshwater bath treatments for the control of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer), infections in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Wiley Online Library*, 25(6), 371–373. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00370.x>
- Svendsen, J. C., Nylund, S., Kristoffersen, A. B., Takle, H., Fossberg Buhaug, J., & Jensen, B. B. (2019a). Monitoring infection with Piscine myocarditis virus and development of cardiomyopathy syndrome in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 42(4), 511–518. <https://doi.org/10.1111/JFD.12974>
- Sviland Walde, C., Bang Jensen, B., Pettersen, J. M., & Stormoen, M. (2021). Estimating cage-level mortality distributions following different delousing treatments of Atlantic salmon (*salmo salar*) in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 44(7), 899–912. <https://doi.org/10.1111/JFD.13348>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O. T., Nilsen, F., Horsberg, T. E., & Jackson, D. (2013). Salmon lice - impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 36(3), 171–194. <https://doi.org/10.1111/JFD.12061>
- Tucker, C. S., Sommerville, C., & Wootten, R. (2000). An Investigation into the Larval Energetics and Settlement of the Sea Louse, *Lepeophtheirus salmonis*, an Ectoparasitic

- Copepod of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Pathology*, 35(3), 137–143. <https://doi.org/10.3147/JSFP.35.137>
- Tucker¹, C. S., Norman², R., Shinn¹, A. P., Bron¹, J. E., Sommerville¹, C., & Wootten¹, R. (n.d.). A single cohort time delay model of the life-cycle of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* on Atlantic salmon *Salmo salar*. *Jstage.Jst.Go.Jp*. Retrieved May 25, 2023, from https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsfp1966/37/3/37_3_107/_article/-char/ja/
- Veterinærinstituttet. (2022). *Resistenstesting mot legemidler og ferskvann hos lakselus 2021 i Mattilsynet*. https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/resistenstesting_mot_legemidler_og_ferskvann_hos_lakselus_2021.46186
- Walde, C. S., Stormoen, M., Pettersen, J. M., Persson, D., Røsæg, M. V., & Bang Jensen, B. (2022). How delousing affects the short-term growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 561, 738720. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738720>
- Wiik-Nielsen, J., Alarcón, M., Jensen, B. B., Haugland, & Mikalsen, A. B. (2016). Viral co-infections in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., displaying myocarditis. *Journal of Fish Diseases*, 39(12), 1495–1507. <https://doi.org/10.1111/JFD.12487>
- Wilson, J. M., & Laurent, P. (2002). Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 192–213. <https://doi.org/10.1002/JEZ.10124>
- Winger, F. A. (2020). *Morphological and gene expressional effects of a 30 second warmwater treatment on Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. <https://munin.uit.no/handle/10037/19217>
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Frontiers in Immunology*, 0, 2597. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.567941>