

# Effekt av termisk avlusing på gjellehelse hos laks: Hos patogenfri laks og i kommersiell produksjon på Vestlandet

Birgit Lilletveit Kvåle



Masteroppgåve i fiskehelse

Institutt for Biovitenskap

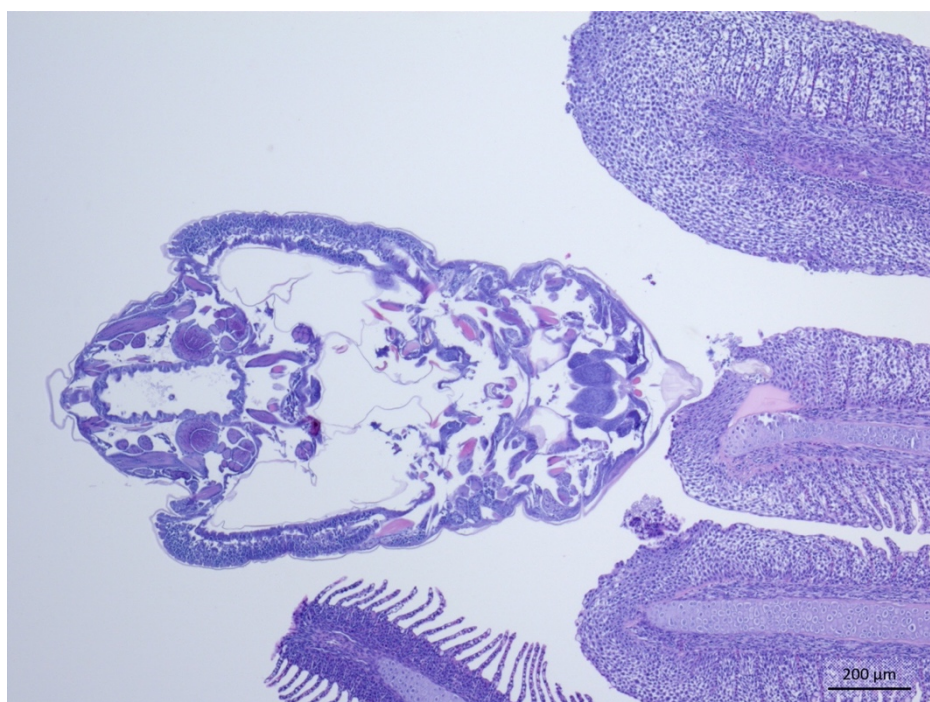
UNIVERSITETET I BERGEN

Juni 2020



# Effekt av termisk avlusing på gjellehelse hos laks: Hos patogenfri laks og i kommersiell produksjon på Vestlandet

Birgit Lilletveit Kvåle



Masteroppgåve i fiskehelse



Institutt for Biovitenskap

Universitetet i Bergen

Juni 2020

© Birgit Lilletveit Kvåle

2020

Effekt av termisk avlusing på gjellehelse hos laks: Hos patogenfri laks og i kommersiell produksjon på Vestlandet

Birgit Lilletveit Kvåle

<http://bora.uib.no/>

# Samandrag

Målet med dette studiet var å studere effektane av termisk avlusing på gjellehelsa til laks. Lakselus utgjør eit stort problem for norsk lakseoppdrett, og behandlingsmetodane er avgrensa grunna resistens mot fleire medikament. Termiske metodar for avlusing er den vanlegaste behandlingsmetoden nytta i dag, men det vert rapportert om skadar og auka dødelegheit i etterkant av slike behandlingar. I tillegg er dårleg gjellehelse eit av hovudproblema i marint lakseoppdrett i Sør-Noreg. Årsakene er ofte samansett av fleire faktorar, der blant anna stress kan påverke negativt. I kommersiell produksjon er det fleire faktorar som kan påføre laksen stress, deriblant handtering og ulike behandlingar. Studiet er ein del av eit større FHF-prosjekt (901514), der eit av måla er å kartleggja effektane av termisk avlusing på gjellehelsa. Tre lokalitetar i kommersiell produksjon og eit smitteforsøk med patogenfri atlantisk laks vart følgde gjennom ei avlusing. Dei fire avlusingane vart vurdert utifrå synleg patologi, dødelegheit, lusetal, histologisk gjellescore og patogenbelastinga i gjelle- og nyrevev før, under og etter termisk avlusing. Smitteforsøket vart gjennomført ved å skånsamt håve tre og tre fisk over i oppvarma vatn, for å studere effekten av varmt vatn på fisken utan å utsetje den for trenging og pumping i forkant.

Resultata viser at verken patogenbelastinga eller histopatologiske endringar i gjellevev vert negativt påverka av termisk avlusing. Gjellehelsa i forkant av behandlinga, i tillegg til førekomst av virussjukdommar syner derimot å ha ei påverking på dødelegheita under behandling. Patogenbelastinga på fisken var høgast ved avlusing på hausten og lågast på våren. Dette samsvarer med gjellescoren, der det vart registrert meir endringar i gjellevevet til fisken som vart behandla på hausten. Denne fisken hadde i tillegg høgare dødelegheit i forkant av behandlinga, som auka ytterlegare etter behandling. Ved avlusing på våren, med lite patogen og låg gjellescore, og ved smitteforsøket var dødelegheita tilnærma uendra etter behandling. Studiet syner òg at termisk avlusing har god effekt på reduksjon av mobile lakselus.

# Forord

Dette studiet er finansiert gjennom FHF-prosjektet (901514): Effekter av behandling mot lakselus, amøbegjellesykdom (AGD), og notrengjøring på gjellehelse hos laks i oppdrett. Studiet vart utført i samarbeid mellom Universitetet i Bergen (UiB), Stiftelsen Industrielaboratoriet (ILAB) og Pharmaq Analytiq.

Fyrst og fremst vil eg gje ein stor takk til hovudrettleiaren min, professor Are Nylund, for eit spennande prosjekt og god hjelp gjennom heile studiet. Du har alltid hatt tid til spørsmål og diskusjonar.

Eg vil og gje ein takk til Heidrun Nylund, Christiane Trösse og Lindsey Moore for god hjelp og opplæring på lab og med statistikk. I tillegg til hjelp med prøvetaking og ikkje minst kjekke turar i felt, ilag med Erwan Lagadec. Takk til Linda Andersen og Steffen H. Blindheim på ILAB for gjennomføring av smitteforsøket og hjelp til tolking av data. Birettleiaren min, Aina-Cathrine Øvergård fortener og ein takk for gjennomlesing og kritiske spørsmål.

Vil og takka dei tre oppdrettsanlegga som har teke del i studiet, for tilgang til fisk og produksjonsdata.

Til slutt vil eg takka medstudentane mine for fem kjekke år, og familie for all støtte og oppmuntring gjennom dei siste fem åra. Spesielt stor takk til mamma for korrekturlesing av oppgåva.

Bergen, 1.juni 2020

Birgit Lilletveit Kvåle

# Forkortingar

Forkortingar	Forklaring
AGD	Amøbisk gjellesjukdom
AP	Arbeidspakke
ASPV	Atlantisk lakseaquaparamyxovirus
ASCV	Atlantisk laksecalicivirus
cDNA	Komplementært DNA
CMS	Kardiomyopatisyndrom (Hjartesprikk)
Costia	Assay mot <i>Ichthyobodo salmonis</i>
Ct-verdi	Terskel syklusverdi
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Dpi	Dagar etter smitte
E	Effektivitet
EF1A	Elongeringsfaktor 1 alfa for atlantisk laks
Epit	Assay mot <i>Candidatus Branchiomonas cysticola</i>
F	Tilsynelatande friske fiskar
FDRG	Fiskesjukdomsgruppa
FHF	Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering
GD	Gjellesjukdom
Gj	Gjeller
Gj.snitt	Gjennomsnitt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
HE	Hematoksylin og eosin
HSMB	Hjarte- og skjelettmuskelbetennelse
<i>IHN</i>	<i>Salmonid novirhabdovirus</i>
ILAB	Stiftelsen Industrielaboratoriet i Bergen
ILAV	Infeksiøs lakseanemivirus
<i>IPNV</i>	<i>Infeksiøs pankreasnekrosevirus</i>
ml	Milliliter
MNE	Gjennomsnittleg normalisert uttrykk
N	Antall individ
NE	Normalisert uttrykk

ng	Nanogram
nM	Nanomolar
NTC	Negativ templatkontroll
Ny	Nyre
O <sub>2</sub>	Oksyngengass
OmELF	Elongeringsfaktor 1 alfa for regnbogeaure
Pch	Assay mot <i>Candidatus Piscichlamydia salmonis</i>
PCR	Polymerase kjedereaksjon
PER	Assay mot X-celle-liknande parasitt
PKX	Assay mot <i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>
PMCV	Piscin myokardittvirus
ppm	Deler per million
<i>PRV</i>	<i>Piscin orthoreovirus</i>
R <sub>2</sub>	Regresjonstal
Real-time RT-PCR	Sanntids revers transkriptase polymerase kjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
S	Svimar-fisk
SalH-4	Salmonid herpesvirus-4
SAV	Salmonid alfavirus
SD	Standardavvik
SGPV	Salmonid gjellepoxvirus
TB-tuf	Assay mot <i>Tenacibaculum</i> spp.
UiB	Universitetet i Bergen
UoS	Universitetet i Stirling
<i>VHSV</i>	<i>Piscin novirhabdovirus</i>
μl	Mikroliter



# Innhold

<b>1</b>	<b>INNLEIING</b>	<b>12</b>
1.1	NORSK LAKSEOPPDRETT	12
1.2	<i>LEPEOPHTHEIRUS SALMONIS</i> (KRØYER, 1837)	13
1.2.1	<i>Livssyklus</i>	13
1.2.2	<i>Kliniske teikn og patologi</i>	14
1.3	BEHANDLING MOT LAKSELUS	15
1.3.1	<i>Thermolicer</i>	17
1.3.2	<i>Optilicer</i>	18
1.4	GJELLEHELSE OG GJELLEPATHOGEN	19
1.5	MÅL FOR OPPGÅVA	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL OG METODE</b>	<b>22</b>
2.1	SMITTEFORSØK: BEHANDLING AV LAKS MED LAKSELUS MED VARMT VATN	22
2.1.1	<i>Smitte med Lepeophtheirus salmonis</i>	23
2.1.2	<i>Behandling med varmt vatn</i>	23
2.2	TERMISKE AVLUSINGAR PÅ TRE LOKALITETAR	25
2.2.1	<i>Behandling med Thermolicer på lokalitet-A</i>	26
2.2.2	<i>Behandling med Thermolicer på lokalitet-B</i>	26
2.2.3	<i>Behandling med Optilicer på lokalitet-C</i>	27
2.3	PRØVETAKING	28
2.4	HISTOPATOLOGI	30
2.5	DETEKSJON AV PATHOGEN	32
2.5.1	<i>RNA ekstraksjon</i>	32
2.5.2	<i>Real-time RT-PCR</i>	33
2.5.3	<i>Effektivitetstest av real-time RT-PCR assay</i>	36
2.6	DENSITET	37
2.6.1	<i>Utrekning av normalisert uttrykk</i>	37
2.6.2	<i>Reverse Ct-verdiar</i>	37
2.7	PREVALENS	38
2.8	DIVERSITETSINDEKS	38
2.9	STATISTIKK	38
<b>3</b>	<b>RESULTAT</b>	<b>39</b>
3.1	SMITTEFORSØK	40
3.1.1	<i>Abiotiske faktorar</i>	40
3.1.2	<i>Biotiske faktorar</i>	41
3.1.3	<i>Behandling med varmt vatn</i>	41
3.1.4	<i>Kartlegging av mikroparasittar</i>	43
3.1.5	<i>Histopatologi</i>	45

3.2	AVLUSING MED THERMOLICER PÅ LOKALITET-A .....	50
3.2.1	<i>Kartlegging av mikroparasittar</i> .....	53
3.2.2	<i>Histopatologi</i> .....	59
3.3	AVLUSING MED THERMOLICER PÅ LOKALITET-B .....	63
3.3.1	<i>Kartlegging av mikroparasittar</i> .....	65
3.3.2	<i>Histopatologi</i> .....	73
3.4	AVLUSING MED OPTILICER PÅ LOKALITET-C.....	76
3.4.1	<i>Kartlegging av mikroparasittar</i> .....	79
3.4.2	<i>Histopatologi</i> .....	84
<b>4</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>87</b>
4.1	EVALUERING AV MATERIAL OG METODAR .....	88
4.2	MIKROPARASITTAR .....	90
4.2.1	<i>Gjellepatogen</i> .....	90
4.2.2	<i>Andre patogen</i> .....	94
4.3	HISTOPATOLOGISKE UNDERSØKINGAR .....	96
4.4	DØDELEGHEIT I SAMBAND MED BEHANDLINGANE .....	97
4.5	SMERTE VED EKSPONERING FOR VARMT VATN .....	99
<b>5</b>	<b>KONKLUSJON OG VIDARE ARBEID</b> .....	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>REFERANSAR</b> .....	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>APPENDIKS</b> .....	<b>112</b>
7.1	TERMISKE AVLUSINGSMETODAR .....	112
7.1.1	<i>Thermolicer</i> .....	112
7.1.2	<i>Optilicer</i> .....	113
7.2	EFFEKTIVITETSTEST .....	113



# 1 Innleiing

## 1.1 Norsk lakseoppdrett

Oppdrett av laks har hatt ein kraftig auke dei siste tiåra, og er i dag ein av dei viktigaste næringane i Noreg. I 2019 vart det produsert i overkant av 1 350 000 tonn atlantisk laks (*Salmo Salar*) og omlag 80 000 tonn regnbogeaure (*Oncorhynchus mykiss*) (Sommerset et al., 2020). Heilt sidan starten av oppdrett har sjukdom vore eit problem som har ført til redusert fiskevelferd og økonomiske tap for næringa. Nokre sjukdommar har vore lettare å motverka enn andre, til dømes med vaksinerings mot enkelte bakteriesjukdommar. I 2019 var det totale tapet av norsk oppdrettslaks i sjøen på 59,3 millionar individ, der dødfisk utgjorde 89 % av desse (Sommerset et al., 2020). *Lepeophtheirus salmonis* er ein av dei største utfordringane norsk lakseoppdrett har i dag (Brooker et al., 2018). Det er få oppdrettslaks som døyr av sjøve infeksjonen, men behandling mot ektoparsitten kan direkte eller indirekte forårsake store tap. I 2019 vart mekaniske skadar som følgje av avlusing rapportert å vere den største årsaka til redusert velferd hos oppdrettsfisk i sjøen (Sommerset et al., 2020).

Lakseoppdrett er i hovudsak delt opp i to ulike fasar; utvikling frå rogn til smolt i ferskvatn, etterfølgd av ein vekstfase i sjøvatn. Den fyrste fasen finn stad i lukka system på land, medan vekstfasen skjer i merdar i sjø. Dei fleste merdane har ingen barriere mot omgivnadane, noko som mogeleggjør utveksling av patogen. Dette kan påverke villfisk og andre oppdrettsfisk på nabolokaliteten, anten ved at det er kort avstand mellom oppdrettslokalitetar eller ved at havstraumar eller båtar fraktar patogen mellom lokalitetar.

## 1.2 *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837)

*L. salmonis* er ein marin ektoparasitt i copepod familien *Caligidae*, og er mest kjend under namnet lakselus (Costello, 2006). Parasitten førekjem på dei fleste artane i slektene *Salmo* (*S. salar* og *S. trutta*), *Salvelinus* (*S. alpinus*) og *Oncorhynchus* (*O. mykiss*). Ein finn hovudsakeleg lakselusa i kaldt vatn i nordleg del av Atlanterhavet og Stillehavet (Torrissen et al., 2013). Det er genetiske og morfologiske skilnadar mellom *L. salmonis* frå Atlanterhavet og Stillehavet, men dei kan kryssast og få fertile avkom. Desse to ulike typane av lakselus utgjer to underartar, *L. salmonis salmonis* som er Atlanterhavslakselusa og *L. salmonis oncorhynchi* som er Stillehavslakselusa (Skern-Mauritzen et al., 2014). Det er den atlantiske underarten som forårsakar problema i norsk lakseoppdrett, og den vert heretter omtala som lakselus.

### 1.2.1 Livssyklus

Livssyklusen til lakselusa består av 8 stadier, der kvart stadium vert definert av eit skalskifte (ecdysis); 2 nauplius, eit copepoditt, 2 chalimus, 2 pre-adulte og eit adult stadium (Hamre et al., 2013, Johnson and Albright, 1991). Dei to naupliusstadia er frittlevande og vert infektive når dei utviklar seg til copepoditt. Copepodittane søkjer etter ein vert ved å registrere endringar i vatnet, trykkbølger, og sym mot det som lagar desse endringane (Heuch and Karlsen, 1997). For å finne ut om det er ein potensiell vert, nyttar dei kjemoreseptorar (Komisarczuk et al., 2017). Når copepoditten har funne ein vert, festar den seg til laksen ved hjelp av andre antenne (Bron et al., 1991). Mot slutten av copepodittstadiet vert det produsert eit fronalfilament som festar lusa til verten. Kort tid etter dette skiftar lusa skal, og går over til chalimusstadium I (Hamre et al., 2013, Johnson and Albright, 1991). Dei pre-adulte individa er festa med frontalfilamentet i det dei skiftar skal, resten av stadiet og i adult stadium er dei festa ved hjelp av andre antenne og vakuum under cephalothorax (Jónsdóttir et al., 1992). Dette gjer at dei kan bevege seg fritt rundt på verten og mellom vertar, og vert omtala som mobile lakselus.

Lakselusa har stor kapasitet til å produsere egg. Hannen vert kjønnsmoden før hoe, adulte hannar festar seg derfor ofte til pre-adulte II hoer (pre-corpula), for så å para seg med dei direkte etter siste skalskifte (Ritchie et al., 1996). Hoe kan produsere opp til 1200 egg per syklus, fordelt i to eggstrengar under normale høve (Costello, 2006, Hamre et al., 2009). Frå ein enkelt befrukting kan holusa produsere 11 par eggstrengar ved 7,2 °C (Heuch et al., 2000).

## 1.2.2 Kliniske teikn og patologi

Gross patologi som følgje av lakselusinfeksjon vert observert dorsalt i hovudregionen og rundt ryggfinna, og ventralt bak analfinna (Jónsdóttir et al., 1992). I desse områda er det låg strøyming og lusa brukar derfor mindre energi på å halde seg fast. Lakselusa lever av å ete slim, hud og blod frå verten (Pike, 1989). Når lusa når dei mobile stadia rekk dei over eit større areal av laksen og kan forårsake større skade på verten (Grimnes and Jakobsen, 1996, Jónsdóttir et al., 1992). Huda til laksefisk er eit metabolsk aktivt organ, beståande av levande celler i alle lag, og er viktig for å oppretthalde normal fysiologisk funksjon. Når lusa lagar sår i huda til laksen, forårsakar dette ein mekanisk endring i denne barrieren som kan føre til osmoregulatorisk svikt (Grimnes and Jakobsen, 1996). Lakselusinfeksjon har og vist seg å auke stressnivået hos verten og påverke immunforsvaret (Mustafa et al., 2000). Dette i tillegg til at lusa lagar opningar i huda, kan føre til sekundære infeksjonar. Mobile stadier kan og bevege seg mellom vertar, og kan derfor potensielt fungere som vektor for overføring av andre patogen (Nylund et al., 1991). Lusa vert eksponert for patogen både frå huda til fisken, men og ved å ete slim og blod. Det er vist at lusa kan vere berar av både *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* og *Moritella viscosa* som forårsakar sjukdommane furunkulose og vintersår hos laks (Taranger et al., 2010a). Virus *Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV)*, *Salmonid alfavirus 3 (SAV3)*, *Salmonid novirhabdovirus (IHNV)* og *Infeksiøs laksesanemivirus (ILAV)* har og vorte isolert frå lus frå infisert fisk (Rolland and Nylund, 1998, Jakob et al., 2011, Petterson et al., 2009, Taranger et al., 2010a). I Chile har ein blant anna sett at *Caligus rogercresseyi* kan vere mekanisk vektor for ILAV, men viruset kan truleg ikkje replikere i lusa og er derfor ikkje ein biologisk vektor (Oelckers et al., 2014). Lakselusa er ein av hovudvertane for mikrosporidien *Paranucleospora theridion*, der laks inngår som mellomvert (Nylund et al., 2009a, Nylund et al., 2009b, Nylund et al., 2010).

## 1.3 Behandling mot lakselus

I opne merdar i sjø er det vanskeleg å førebyggje lakselusinfeksjon. Sidan lakselusa byr på store utfordringar for fiskevelferda, både for oppdrettsfisk og villfisk, har det vorte utvikla ei eiga forskrift for kontroll av parasitten (Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg) i Noreg (Kragesteen et al., 2019). I Nord-Trøndelag og sørover skal det frå veke 16 til veke 21 vere mindre enn 0,2 vaksne holus i gjennomsnitt per fisk i oppdrettsanlegget (Forskrift om lakselusbekjempelse, 2012, §8). I Nordland, Troms og Finnmark skal det vere mindre enn 0,2 vaksne holus frå veke 21 til veke 26. Resten av året er grensa mindre enn 0,5 vaksne holus i begge områda. Dersom eit oppdrettsanlegg har meir lus enn det som er lovleg, må det gjennomførast tiltak for å redusere mengda. I dei fleste tilfelle betyr det at ein må gjennomføre ei behandling og i dei mest ekstreme tilfella må lokaliteten slakte fisken.

Det finnes ulike typar behandling mot lakselus; medikamentelle, biologiske og mekaniske behandlingar. Tidlegare nytta ein i hovudsak medikament for å behandle laks mot lakselus, og eit av dei fyrste midla som vart nytta var organofosfatar i badbehandlingar (Torrissen et al., 2013). Etter einsidig bruk av organofosfatar sidan tidleg på 80-talet, fekk ein påvist dei fyrste tilfella av organofosfatresistens (Sevatdal and Horsberg, 2003). Alternative badbehandlingar vart testa ut, deriblant pyrethrum. Dette middelet viste seg å vere problematisk å administrere, og er derfor ikkje i bruk i dag (Torrissen et al., 2013). Dei syntetiske pyretroidane deltamethrin og cypermethrin har vorte nytta i lusebehandlingar, men og mot desse har ein påvist resistens (Sevatdal and Horsberg, 2003, Helgesen et al., 2020). Medikament kan og administrerast oralt. Det vil seie at legemiddelet vert tilført eit fôr som i ein periode erstattar det vanlege fôret. Fordelen med å nytte oral behandling mot lakselus er at behandlinga vert lite arbeidskrevjande og meir skånsam for fisken. Ulempa er at doseringa vert mindre nøyaktig grunna ulik storleik på fisken, og at det berre er dei som aktivt et som får behandling. Emamectin benzoate (SLICE) er det legemiddelet som har vorte mest nytta som oralt legemiddel mot lakselus i Noreg (Igboeli et al., 2012), men i 2007 fekk ein påvist resistente lus fleire stadar langs kysten (Hjeltnes et al., 2019, Skjelstad et al., 2008). Grunna dette har bruken av legemiddelet gått kraftig ned dei seinare åra.

Resistensutvikling er lakselusas forsvar mot lusemidlane. Sjølv når behandlingar vert gjennomført optimalt, er det ofte nokre få parasittar som overlever (Aaen et al., 2015). Dersom denne eigenskapen er arvbar, vil og neste generasjon vere meir motstandsdyktig mot behandlinga, og med tida vil ein oppnå ein populasjon som er resistent mot middelet (Sevatdal

and Horsberg, 2003). Resistens vert godt dokumentert og sjekka ved å telje parasittar før og etter behandling. I tillegg til bruken av bioassay som er ein toksikologisk test der ein eksponerer lakselus for ulike konsentrasjonar av eit aktuelt legemiddel (Helgesen and Horsberg, 2013).

Bruken av hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) auka kraftig då lusa byrja å utvikla resistens mot fleire av dei andre medikamenta (Overton et al., 2018).  $H_2O_2$  vert nytta som badmiddel både i brønnbåt og direkte i merda med presenning rundt, og vart betrakta som lite skadeleg for miljøet sidan det etter kort tid vert brote ned til vatn og oksygen og ikkje akkumulerer i miljøet. Effekten av  $H_2O_2$  på lusa er truleg danning av oksygenbobler i blodet, som fører til mekanisk paralyse og lusa slepp taket frå laksen, i tillegg til effekt på membran og eggstrengar (Aaen et al., 2014). Det finnes derimot utfordringar med denne metoden òg. Blant anna har ein sett auka dødelegheit i etterkant av behandlingane, spesielt ved høge vass temperaturar og høg dose  $H_2O_2$  (Overton et al., 2018). I tillegg har det vorte påvist redusert sensitivitet mot  $H_2O_2$  i fleire områder i Noreg (Helgesen et al., 2020).

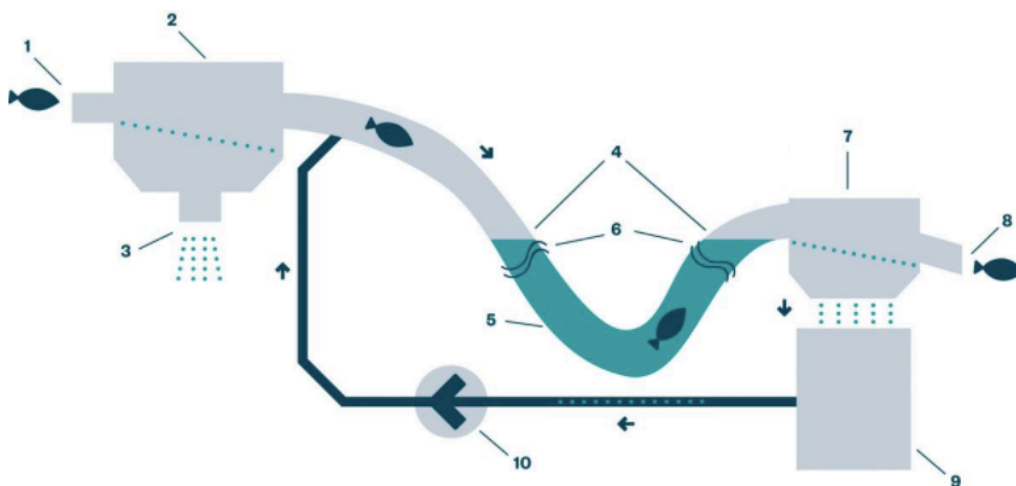
I dei seinare åra har ein sett på moglegheiter for å behandle fisken med medikamentfrie behandlingar. Dette både fordi ein har sett resistensutvikling mot mange av medikamenta, men og for å redusere bruken av medikament i oppdrettsnæringa. Ein av dei medikamentfrie behandlingane er biologisk avlusing. Dette inneber å ha rensefisk i merdane som et lus av laksen. Denne metoden for avlusing er lite arbeidskrevjande og lite stressande for fisken. Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) og ulike artar av leppefisk (*Labridae*) vert nytta som rensefisk i Noreg (Sommerset et al., 2020). I 2019 vert det sett ut i overkant av 49 millionar rensefisk, der 46 % av desse var rognkjeks. Rognkjeks som vert nytta som rensefisk kjem i hovudsak frå oppdrett, medan leppefisken i hovudsak er villfanga. Rognkjeks har ein raskare produksjonssyklus enn leppefiskane, i tillegg til at den er aktiv ved lågare temperaturar (aktiv ned til 4 °C samanlikna med leppefisk som ikkje er under 6 °C) (Nytrø et al., 2014, Sayer and Reader, 1996). Den auka etterspurnaden etter leppefisken i Noreg har ført til overfiske og import frå Sverige (Skiftesvik et al., 2014, Sommerset et al., 2020). Dette fører til at leppefisken vert transportert over store avstandar, noko som ikkje er optimalt med tanke på spreiding av patogen. Både oppdretta og villfanga rensefisk kan vere berar av ulike patogen, og spreie dette til oppdrettslaks og miljøet rundt. I tillegg ser ein høg dødelegheit og sjukdomsproblem hos rensefisken, spesielt i samband med utsett og ikkje-medikamentell avlusing (Brooker et al., 2018, Treasurer, 2012, Sommerset et al., 2020).



Andre medikamentfrie behandling er mekaniske behandlingar i form av børsting eller spyling, termiske behandlingar med varmt vatn og ferskvassbehandling. Desse metodane vert i dag brukt i ein større grad enn medikamentelle behandlingar (Sommerset et al., 2020). Alle desse behandlingane er effektive for å redusere lusetalet, men ein har sett utfordringar både med fiskevelferda og økonomiske kostnadar ved behandlingane (Grøntvedt et al., 2015, Overton et al., 2019, Roth, 2016, Sommerset et al., 2020).

### 1.3.1 Thermolicer

Thermolicer er ei form for termisk avlusing der ein nyttar oppvarma vatn for å få lusa til å sleppe laksen. Det er eit gjennomstrømingssystem der fisken vert pumpa inn i Thermoliceren som er plassert i ein container på ein lekter (Grøntvedt et al., 2015). Fisken passerer fyrst ein silkasse som silar av sjøvatn, før fisken vert bada i behandlingsvatnet (30-34 °C) i 30 sekunder (figur 1.1)(Info frå produsenten, sjå appendiks figur 7.1). Behandlingsvatnet vert deretter silt av, der lusa som har sloppe fisken vert samla opp og fisken vert ført tilbake til merda. Det silte behandlingsvatnet vert deretter leda tilbake til varmetanken for reinsing, lufting og oppvarming før det pumpes tilbake til behandlingsskammeret. I forsøk med denne avlusingsmetoden har ein sett god effekt på reduksjon av mobile lus (Grøntvedt et al., 2015). Dei signifikante skadane som vart observert på fisken i etterkant av behandlinga, var i hovudsak snuteskadar og finneskadar som var knytt til pumping og trenging på veg inn i Thermoliceren.



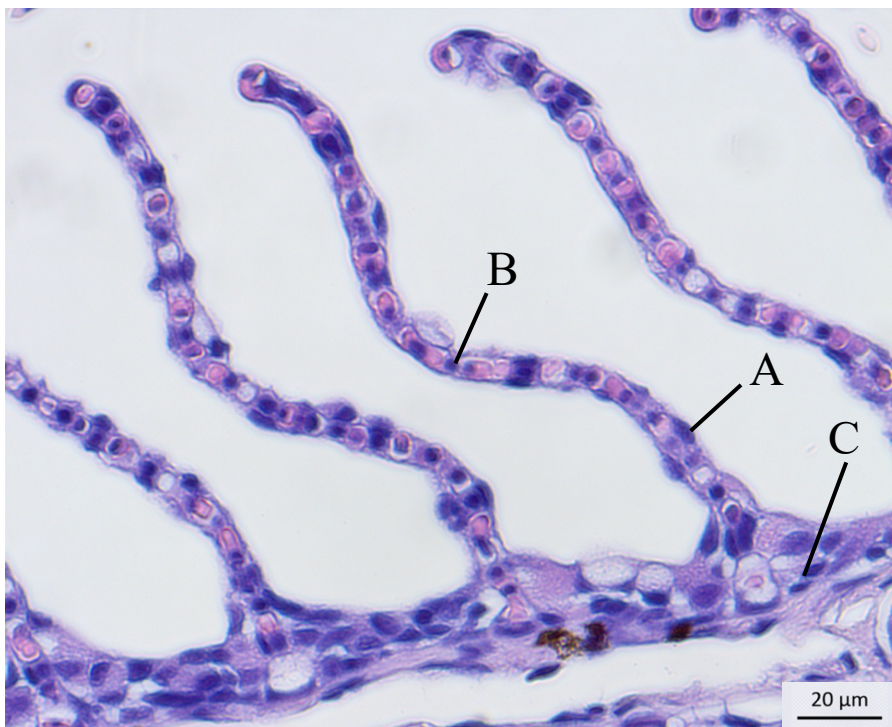
**Figur 1.1.** Skjematisk framstilling av Thermolicer. **1:** Fisken vert pumpa inn i systemet. **2:** Silkefilter som silar av sjøvatn. **3:** Sjøvatn vert filtrert og sleppt ut. **4:** Fisken vert utsett for lunka vatn. **5:** Behandlingssøyle, lukka system med varmt vatn (30-34 °C). **6:** Vassoverflate i behandlingssøyla. **7:** Vassavskiljar for behandlingsvatnet. **8:** Fisken kjem ut av systemet. **9:** Oppvarma vatn vert sirkulert tilbake til vassstanken for reinsing, lufting og gjenoppvarming. **10:** Behandlingsvatnet vert pumpa tilbake til behandlingssøyla. Figuren er henta frå produsenten si nettside (Steinsvik.no).

### 1.3.2 Optilicer

Optilicer er på same måte som Thermolicer ein termisk avlusing, der ein nyttar varmt vatn for å fjerne lakselus frå fisken. Fisken vert pumpa inn i Optiliceren som består av to separate skovlehjul, og sjøvatnet vert silt av (Roth, 2016). Skovlehjula fører fisken gjennom eit kar som består av oppvarma sjøvatn. Eksponeringstida kan justerast frå 21 sekund og oppover, og behandlingstemperaturen kan regulerast opp til 36 °C (Info frå produsenten, sjå appendiks figur 7.2). Etter varmtvassbadet vert behandlingsvatnet silt av. Lusa som har sloppe taket under behandlinga vert samla opp, og fisken vert ført tilbake til merda. Skovlene som leier fisken gjennom badet med temperert vatn, gjer at ein får god kontroll på behandlingstida. Optilicer er ein effektiv metode for å fjerne mobile lus, med ein avlusingseffektivitet på 98 % (Roth, 2016). Ein har sett at fisken har fått skadar som følge av behandlinga, men i hovudsak kjem desse skadane i samband med den mekaniske delen av behandling, med pumping og trenging før og etter varmebadet. Roth (2016) viste at behandling ikkje skada gjellevevet, men at status på fisken og tekniske vilkår ombord på behandlingsfartøyet er av betydning for fiskevelferda i etterkant.

## 1.4 Gjellehelse og gjellepatogen

Gjellene er det viktigaste respirasjonsorganet til laksefisk (Kryvi and Poppe, 2016). Dei har fire gjellebogar på kvar side som er dekt av eit gjellelokk. Kvar gjelleboge har to rader med primærlameller, og på over- og undersida av kvar primærlamelle er det store mengder sekundærlameller. Sekundærlamellene har ei enkel oppbygging med einlaga plateepitel ytst og pillarceller innanfor (figur 1.2). Pillarcellene er spesialiserte endotelceller og danner kapillæra. Sekundærlamellene utgjør ei overflate med stort areal, der gassutvekslinga skjer. Blodet vert oksygenert ved at vatnet passerer i motsett retning av blodstraumen i lamellene, som fører til stor skilnad i oksygenkonsentrasjon og dermed effektiv gassutveksling. Frå gjellene går oksygenert blod ut i kroppen via dorsalaorta, og via arteriar til organ. Oksygenfattig blod vert samla i eit venesystem og ført tilbake til hjarta, der blodet igjen vert ført til gjellebogane via ventralaorta. Laksen har òg ei delvis tilbakedanna gjelle i fremre del på innsida av gjellelokket. Denne gjellestrukturen vert kalla pseudobranch. Funksjonen er ikkje heilt kjent, men ein veit at den får allereie oksygenert blod frå 1. gjelleboge og sender dette til auga. Den bidreg derfor til å sikre oksygenforsyninga til retina. Gjellene har og andre viktige funksjonar som osmoregulering, utskiljing av nitrogen, pH regulering og hormonproduksjon, og er eit viktig immunologisk organ (Herrero et al., 2018, Magnadóttir, 2006).



**Figur 1.2.** Mikroskopisk snitt av sekundærlameller til atlantisk laks. Snittet syner oppbygginga til sekundærlameller med **A:** epitelcelle, **B:** pillarcelle og **C:** primærlamelle. Snittet er frå fisk før behandling i smitteforsøket, stav = 20  $\mu\text{m}$ .

Gjellene er i nær kontakt med miljøet rundt, og dermed og i kontakt med patogen, giftstoff, partiklar og organismar som er i miljøet rundt merdane (Herrero et al., 2018, Kryvi and Poppe, 2016). Avstanden mellom blod og vatn er kort grunna den enkle oppbygginga til sekundærlamellene, dette gjer gjellene til ein skjør struktur og utsatt for infeksjonar og skadar. Dette kan redusere gjellenes funksjon og kapasitet, og er eit av hovudproblema i marint lakseoppdrett (Herrero et al., 2018, Mitchell and Rodger, 2011). To av dei vanlegaste patologiske endringane i gjelleveg som følgje av infeksjon og skadar er hypertrofi og hyperplasi av epitelceller, som og kan føre til samanvoksingar av sekundærlameller (Mitchell and Rodger, 2011, Gjessing et al., 2018). Større og fleire epitelceller vil føre til redusert gjelleoverflate og auka diffusjonsvegen for gassar. Evna til osmoregulering kan og reduserast ved at kloridceller vert omringa av epitelceller (Kryvi and Poppe, 2016). Ei rekkje patogen har vorte assosiert med gjellesjukdom (GD), både virus, bakteriar og parasittar (Herrero et al., 2018, Mitchell and Rodger, 2011). Ofte vert fleire patogen påvist ved GD, og det er lite kunnskap om kva påverking dei ulike patogena har åleine.

Blant virus som infiserer gjellene, finn ein Salmonid gjellepoxvirus (SGPV), Infeksiøs lakseanemivirus (ILAV) og Atlantisk lakseparamyxovirus (ASPV) (Nylund et al., 2008, Kvellestad et al., 2005, Nylund et al., 2003). *Candidatus* Piscichlamydia salmonis, *Candidatus* Clavichlamydia salmonicola, *Candidatus* Synngnamydia salmonis, *Candidatus* Branchiomonas cysticola og *Tenacibaculum maritimum* er bakteriar ein finn i gjellene til laks (Toenshoff et al., 2012, Draghi et al., 2004, Karlsen et al., 2008, Nylund et al., 2014). I tillegg til desse virusa og bakteriane vert parasittane *Ichthyobodo salmonis* og *Paranucleospora theridion* påvist i gjeller (Hellebø et al., 2017, Nylund et al., 2011, Isaksen et al., 2011, Frisch et al., 2018). I Nord-Noreg kan og parasitten *Parvicapsula pseudobranchicola* påverke laksens gjellehelse (Nylund et al., 2005). I tillegg vert amøben *Paramoeba perurans* påvist i gjeller, og forårsaka den spesifikke gjellesjukdommen AGD (Young et al., 2007). Kunnskap om kva påverking kvar enkelt av desse patogena har for laksens gjellehelse er avgrensa, men truleg er fleire ytre faktorar av tyding. Til dømes temperatur i sjøen, planktonoppblomstring og stress forårsaka av ulike behandlingar som til dømes mekaniske og termiske avlusing, ferskvassbehandling mot AGD og lakselus, reinsking av nøter, sortering og andre handteringsoperasjonar. Slike endringar som avvik frå laksens naturlege levesett, fører til stress. Det er lite kjent korleis slike stress-situasjonar påverkar gjellehelsa til oppdrettslaksen. I eit sterilt miljø vil laksen kunne bruke all energien på å rette opp igjen ein normal homeostase, men når det er patogen til stades vil denne kostnaden truleg auke. Det kan medføre store endringar i gjellevevet, noko som igjen kan føre til sjukdomsteikn, redusert velferd og i alvorlege tilfelle resultere i dødelegheit.

## 1.5 Mål for oppgåva

Målet for denne masteroppgåva er å kartleggje korleis termisk behandling mot lakselus påverkar gjellehelsa hos laks. Det vil bli lagt særleg vekt på patologiske endringar i gjellevev, og endringar i belastning av mikroparasittar på gjellene. Termisk behandling skal utførast ved laboratorieforsøk og på tre lokalitetar, for å kartleggje om ei eventuell påverking er ulik for patogenfri laks samanlikna med laks frå kommersiell produksjon.

- Korleis påverkar termisk avlusing fisken?
- Er påverknaden ulik for patogenfri laks som ikkje vert utsett for trenging og pumping under behandlinga, samanlikna med tradisjonell behandling i opne merdar i sjø der det er patogen til stades?
- Har mengda og type mikroparasittar på gjellene noko å seie for fiskevelferda etter behandling?

## 2 Material og metode

Materialet i dette studiet er ein del av eit større FHF-prosjekt (prosjektnummer 901514) der målet er å kartleggja effektar av behandling mot lakselus på gjellehelsa hos laks i oppdrett. Studiet inneheld material frå tre lokalitetar på Vestlandet, der det vart gjennomført termisk behandling av lakselus i perioden april-desember 2019. I prosjektet vart og patogenfri atlantisk laks (*Salmo Salar*) smitta med copepodittar og behandla med varmt vatn 15 dpi. Smitteforsøket vart planlagt og gjennomført av Stiftelsen Industrielaboratoriet (ILAB), i samband med fiskejukdomsgruppa (FDRG) ved Universitetet i Bergen (UiB).

Material frå både smitteforsøket og dei tre lokalitetane vart analysert ved Universitet i Bergen (UiB), Pharmaq Analytiq og Universitetet i Stirling (UoS). Vevsprøvar til real-time RT-PCR vart prosesserte ved FDRG (UiB) sine fasilitetar på Høyteknologisenteret. Histologiprøvene vart undersøkt både hos Pharmaq Analytiq og UiB. I denne masteroppgåva vert resultat frå real-time RT-PCR av gjelle- og nyrevev, i tillegg til histologi av gjeller presentert og diskutert.

### 2.1 Smitteforsøk: Behandling av laks med lakselus med varmt vatn

Smitteforsøket vart gjennomført i perioden 19. februar til 19. mars 2019 ved ILAB sine fasilitetar på Høyteknologisenteret i Bergen. Målet med smitteforsøket var å kartleggja kva effektar behandling med varmt vatn mot lakselus hadde på patogenfri atlantisk laks. Der fisken ikkje var utsett for trenging og pumping i forkant av behandlinga.

På dag 1 vart 240 post-smolt med ei snittvekt på 217 gram satt inn i seks kar som romma 450 liter (N= 40 fisk per kar). Fisken som vart nytta i forsøket vart produsert ved ILAB sine fasilitetar, rogn kom frå Stofnfiskur på Island. Forsøksfisken vart screena for *Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV)*, *Infeksiøs lakseanemivirus (ILAV)*, *Piscin orthoreovirus (PRV)*, *Piscin myokardittvirus (PMCV)* og *Salmonid gjellepoxvirus (SGPV)* då den var rundt 15 gram.

Alle kara var i same hall der lysregimet gjennom heile forsøket var 12 timar lys etterfølgt av 12 timar mørke (12:12). Fisken vart sett inn på 10 °C og 25 ‰. Etter tre dagar vart temperaturen og saliniteten gradvis auka til 12 °C og 34 ‰. Gjennomstrøyminga i kara var 850 liter/time, og oksygenmetninga i kara vart forsøkt halde rundt 80-90 % gjennom heile forsøket. Fisken vart føra omlag 117 gram før per dag, med unntak av før smitte, behandling og prøveuttak då den

vart svelta eit døgn i forkant. Overflødig fôr og dødfisk vart regelmessig fjerna for å sikre eit godt karmiljø. I tillegg vart temperatur og salinitet i kara overvaka og registrert dagleg. Den daglege røktinga av fisken vart gjennomført av tilsette på ILAB.

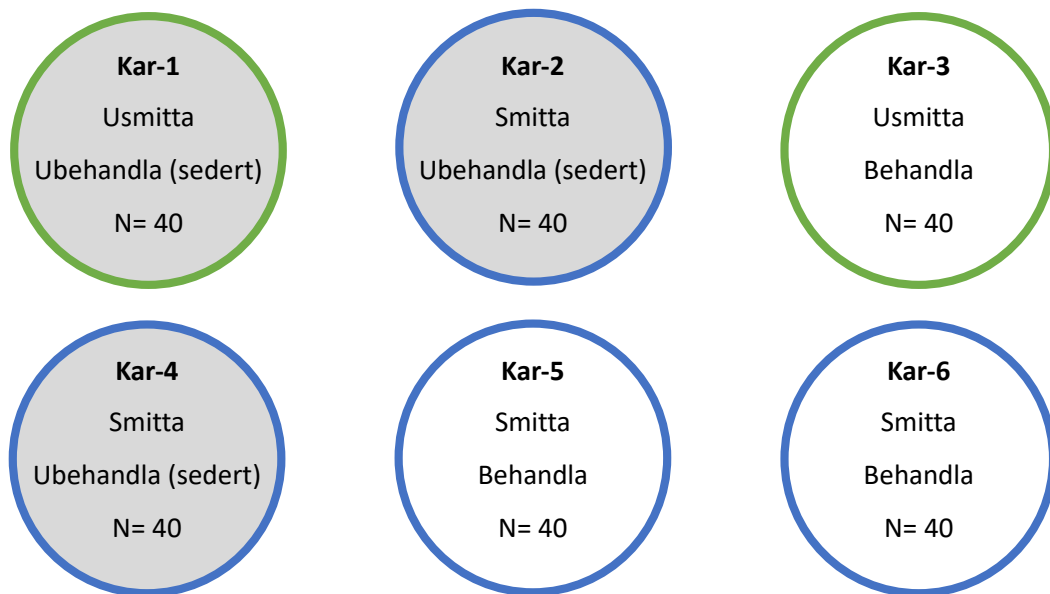
Forsøket var godkjent av Mattilsynet (Søknad 18259: *Effekter av behandling og notrengjøring på gjellehelse*).

### **2.1.1 Smitte med *Lepeophtheirus salmonis***

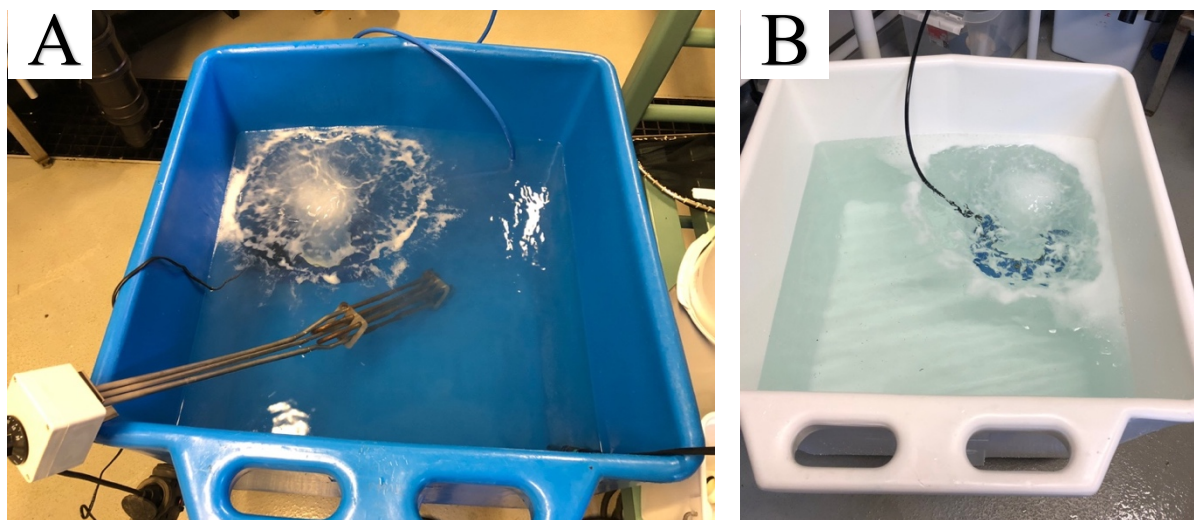
Seks dagar etter at fisken vart sett inn i kara (25. februar) vart fire av kara (kar-2, kar-4, kar-5 og kar-6) smitta med copepodittar (figur 2.1). Smittinga vart gjennomført ved å stoppe vasstilførselen og redusere vassnivået i kara, før ein tilførte 25 copepodittar per fisk i dei aktuelle kara. Copepodittane var produsert av ILAB frå stamma LsGulen (Hamre et al., 2009).

### **2.1.2 Behandling med varmt vatn**

Fisken i tre kar vart behandla med varmt vatn 15 dpi; to smitta kara (kar-5 og kar-6) og eit usmitta kar (kar-3) (figur 2.1). Det vart laga eit behandlingskar med 150 liter sjøvatn (34 ‰) som vart varma opp til 34 °C ved hjelp av ein 1500W varmekolbe (figur 2.2A). For å unngå overmetning av O<sub>2</sub> ved oppvarminga vart det nytta trykkluft. I tillegg var det ei akvariepumpe i karet, for å sikre sirkulasjon i vatnet. Behandlinga vart gjennomført ved å stoppe vasstilførselen i kara, tilsette trykkluft og 6,3 ppm Aqui-S for å sedere fisken. Etter omlag 15 minutt var fisken roleg og vasstanden i karet vart senka. Tre og tre fisk vart håva over i behandlingskaret og haldne i det varme vatnet i 30 sekund i håven, før dei vart overført til normal temperatur i eit oppvavningskar (figur 2.2B). I oppvavningskaret var vatnet 12 °C, hadde ein salinitet på 34 ‰ og var tilsett Aqui-S. Då all fisken i det aktuelle karet hadde gjennomgått behandlinga, vart dei håva over frå oppvavningskaret til det opphavelige karet, og vasstilførselen vart starta igjen. Temperatur, salinitet og oksygen vart overvaka kontinuerleg gjennom heile behandlinga. Kar-3 vart behandla fyrst, deretter kar-5 og til slutt kar-6. Dei to siste kara var smitta med lus. Lusa som fall av under behandlinga vart samla opp i ei kvit bakke etter kvar håving, ved at håven vart skylt i vatnet i bakken. Etter at eit kar var ferdig behandla vart vatnet i oppvavningskaret tappa ut og all lusa som hadde sleppt fisken vart tald og registrert. Fisken i dei tre kara som ikkje vart behandla, vart ikkje flytta ut av kara. I desse kara vart vasstilførselen stoppa, fisken vart sedert med Aqui-S og vasstanden redusert, før vasstilførselen vart sett på igjen.



**Figur 2.1.** Skjematisk oversikt over kara i forsøket (N= antall fisk). Grøn ring syner kara som ikkje vart smitta med copepodittar, blå ring rundt kara som vart smitta. Dei grå kara vart ikkje behandla med varmt vatn, dei kvite kara vart behandla.

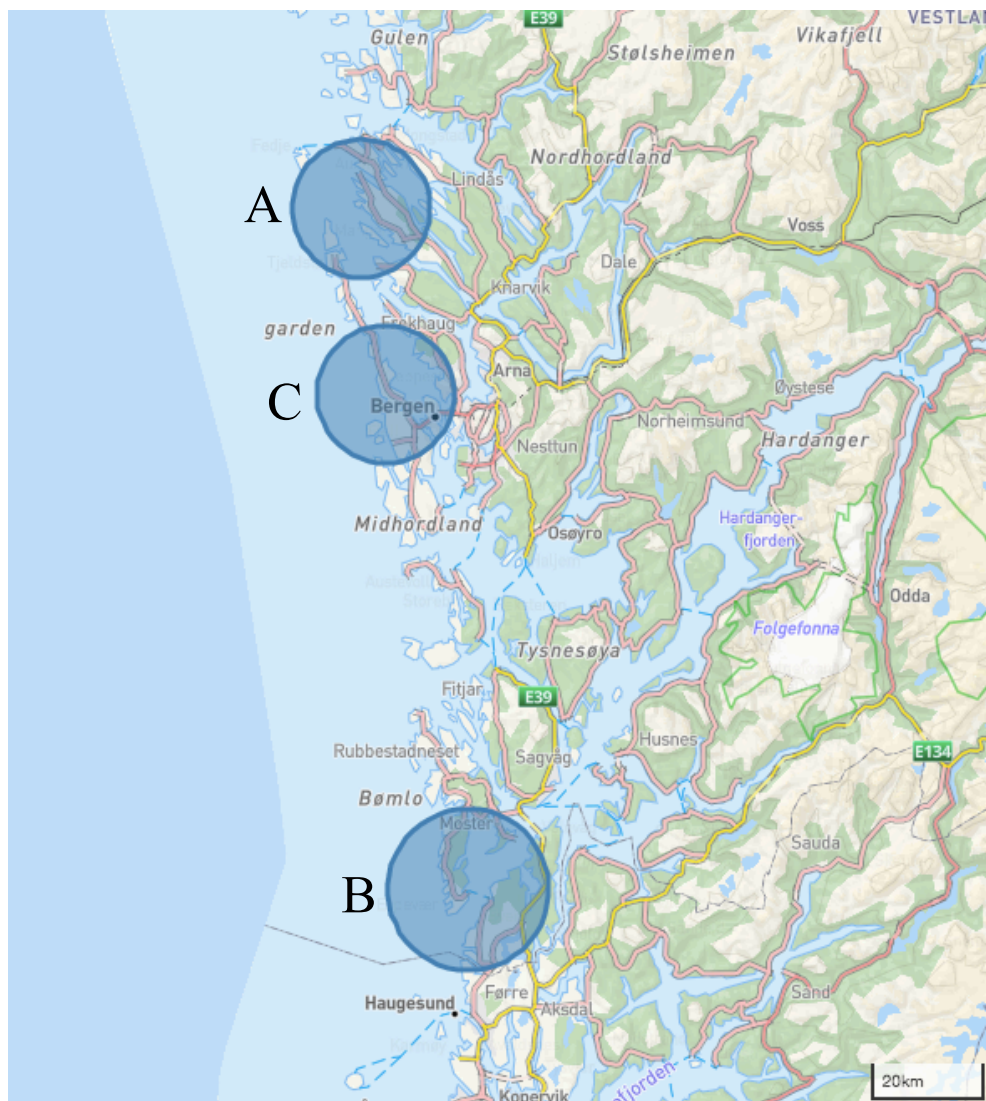


**Figur 2.2.** A: Behandlingskaret (34 °C og 34 ‰), med varmekolbe, akvariepumpe, trykkluft og måleinstrument for salinitet, oksygen og temperatur. B: Oppvaskingskaret med 12 °C, 34 ‰ sjøvatt og trykkluft.



## 2.2 Termiske avlusingar på tre lokalitetar

Tre termiske avlusingar i kommersiell produksjon på tre ulike lokalitetar vart følgde. Alle lokalitetane ligg i Vestland fylke. Lokalitet-A og -B vart behandla med Thermolicer, medan lokalitet-C nytta Optilicer. Lokalitet-A, som ligg i området rundt Radøy, behandla atlantisk laks (*Salmo Salar*) i april 2019. Lokalitet-B behandla atlantisk laks i september 2019. Denne lokaliteten ligg i området rundt Bømlo. Lokalitet-C behandla regnbogaure (*Oncorhynchus mykiss*) med Optilicer i desember 2019. Denne lokaliteten ligg i området rundt Bergen (figur 2.3). Grunna anonymisering av lokalitetane vert dei kalla A, B og C, og eksakt plassering vert ikkje oppgjeve.



**Figur 2.3.** Kart som syner omtrentleg plassering av dei tre lokalitetane. Lokalitet-A nord for Bergen, i området rundt Radøy (A). Lokalitet-B sør for Bergen, i området rundt Bømlo (B). Lokalitet-C i området rundt Bergen (C). Kart henta frå Kommunekart.no.

### **2.2.1 Behandling med Thermolicer på lokalitet-A**

Lokalitet-A ligg nord i Hordaland, i området rundt Radøy, og består av seks merder med atlantisk laks. Fisken i den aktuelle merda vart sett ut i starten av september 2018, med ei snittvekt på 153 gram. Det vart sett ut 140 700 fisk med Stofnufiskur genetikk. Fisken hadde ikkje gjennomgått behandlingar før den aktuelle behandlinga 05.04.2019, og hadde heller ingen diagnosar av betydning. Det var rognkjeks i merda. Dødelegheita i merda før behandling var låg, med eit gjennomsnitt på 9 døde per dag i månaden før. På behandlingstidspunktet hadde fisken ei gjennomsnittleg vekt på 1050 gram.

Behandlinga vart gjennomført med behandlingsbåten RoServer, som har Thermolicer montert ombord. Fisken vart trengt med perleband, pumpa inn i brønnen og ført gjennom Thermoliceren på veg tilbake i merda. Behandlingstemperaturen var 34 °C, og behandlingstida 30 sekund.

Temperaturen i sjøen låg mellom 5,8 og 6,9 °C i månaden før behandling, og oksygenmetninga mellom 85-100 %. Saliniteten i sjøen var tilnærma full sjø, over 32 ‰.

### **2.2.2 Behandling med Thermolicer på lokalitet-B**

Lokalitet-B ligg i Sunnhordaland, i området rundt Bømlo, og består av seks merder med atlantisk laks. Fisken som inngår i dette studiet, vart sett ut i starten av september 2018. Det vart sett ut i overkant av 162 000 smolt med Salmobreed genetikk og ei snittvekt på 78 gram. I settefiskfasen var fisken vaksinert med Alphaject micro 6 og Alphaject micro 1 PD. Fisken hadde tidlegare i produksjonen gjennomgått fire behandlingar mot lakselus. Ein med bruk av ferskvatn i april, ein med Thermolicer og ein med Optilicer i august, og ein mekanisk avlusing med Skamik i september. Før behandlinga 20.09.2019 hadde gruppa fått påvist hjartesprekk (CMS) og gjellebetennelse. Det var leppefisk i merda. Gjennomsnittleg dagleg dødelegheit i månaden før behandlinga var 110 døde per dag. På behandlingstidspunktet hadde fisken ei gjennomsnittleg vekt på 2900 g.

Thermolicer vart brukt ved behandling, og behandlinga vart gjennomført ved at fisken vart pumpa gjennom Thermoliceren og over i ei ny merd. Behandlingstemperaturen var 33,5-34,0 °C, og behandlingstida 30 sekund.

Temperaturen låg mellom 14,2 og 17,5 °C i månaden før behandling, og saliniteten var tilnærma fullt sjøvatn.

### **2.2.3 Behandling med Optilicer på lokalitet-C**

Lokalitet-C ligg i området rundt Bergen, og består av seks merder; tre med atlantisk laks og tre med regnbogeaure. I dette studiet er det merd 2 med regnbogeaure som inngår. Det vart sett ut i overkant av 180 600 fisk med AquaGen genetikk og ei snittvekt på 177 gram våren 2019 i denne merda. Det vart opplyst om gjelleblødning og pankreassjukdom (PD) hos fisken, som på behandlingstidspunktet hadde ei gjennomsnittleg vekt på 2200 g. Regnbogeauren i denne merda hadde ein måned tidlegare gjennomgått ei behandling mot lakselus med bruk av Optilicer.

Behandlinga 03.12.2019 vart gjennomført med Optilicer, med ein temperatur på 32,8 °C og ei behandlingstid på 30 sekund. Under innpumpinga til Optiliceren skjedde det ein feil, som resulterte i ein del dødelegheit i kastet. Dødelegheit i forkant av behandling vart ikkje oppgjeve av lokaliteten.

I veka før behandlinga var temperaturen i sjøen mellom 5,3 og 11,5 °C, og oksygenmetninga mellom 67-111 %. Saliniteten var tilnærma fullt sjøvatn.

## 2.3 Prøvetaking

Prøvetakinga var i hovudsak lik ved både smitteforsøket og dei tre avlusingane i felt, med tre prøveuttak i samband med kvar avlusing (tabell 2.1). Det fyrste prøveuttaket var i forkant av behandlinga, og det siste to-sju dagar etter behandling. Ved smitteforsøket var det andre prøveuttaket ein dag etter behandling. Ved avlusingane i felt tok tilsette på lokaliteten ut fisk som døydde under behandlinga. Denne fisken vart fryst ned og fakta til FDRG ved UiB for prøvetaking. Prøveuttaka før og etter behandling i felt vart gjennomført på lokaliteten, med unntak av etter behandling på lokalitet-C der fisken vart frakta til FDRG. Ved smitteforsøket vart det teke ut 10 fisk frå kvart kar ved kvart uttak, i alt 60 fisk ved kvart uttak. Ved prøveuttaka i felt vart det teke ut 30 fisk frå den aktuelle merda ved kvart prøveuttak, til saman 90 fisk frå kvar lokalitet. Med unntak av lokalitet-C der det var problem med lift-up systemet, og fisk som døydde i samband med behandling ikkje vart teke ut før to dagar etter. Dødfisken frå denne lokaliteten har derfor truleg døydd to dagar etter behandlinga. Etter behandling vart det teke ut 13 svimara og 12 tilsynelatande friske fiskar. I alt 85 fisk frå denne lokaliteten.

**Tabell 2.1.** Dato for prøveuttaka ved smitteforsøket på ILAB og avlusing ved lokalitet-A, -B og -C. Tre prøveuttak ved kvar behandling, i parentes antall dagar før/etter behandlinga. N= antall fisk som vart undersøkt og tatt prøvar frå.

	<b>Uttak før behandling</b>	<b>Uttak i samband med behandling</b>	<b>Uttak etter behandling</b>
<b>Smitteforsøk</b>	11. mars (1d før) N= 60 (10 fisk * 6 kar)	13. mars (1d etter) N= 60 (10 fisk * 6 kar)	19. mars (7d etter) N= 60 (10 fisk * 6 kar)
<b>Lokalitet-A</b>	25. mars (11d før) N= 30	05. april (død under) N= 30	08. april (3d etter) N= 30
<b>Lokalitet-B</b>	18. august (2d før) N= 30	20. august (død under) N= 30	27. august (7d etter) N= 30
<b>Lokalitet-C</b>	29. november (4d før) N= 30	05. desember (død 2d etter) N= 30	05. desember (2d etter) N= 25 (13 svimara + 12 friske)

Ved prøvetaking vart følgjande registrert: vekt (g) og lengde (cm) til fisken, mobile lus og eventuelle ytre lesjonar. Andre gjelleboge på venstre side vart teke ut til histologi ved alle prøveuttaka under smitteforsøket, og ved uttaka før og etter behandling i felt. Veva vart fiksert i 10 % buffra formalin fram til vidare prosessering. For uttak av gjellevev til real-time RT-PCR vart andre gjelleboge på høgre side nytta. Analyseprøven vart teke frå gjellas apikale del, og var på storleik med eit fyrstikkhovud (figur 2.4). Den resterande gjellebogen vart lagra som backup-prøve. Analyseprøven vart lagt i 2.0 ml Safe-Lock Tubes (Eppendorf), lagt på tørris under prøvetakinga og lagra på -25 °C til vidare analyse. Det vart og teke ein backup-prøve av den midtre delen av nyra. Backup-prøvane vart lagt på tørris under prøvetakinga og lagra på -80 °C i 2.0 ml Nunc-rør (Thermo Scientific). Eventuelle indre lesjonar vart og registrert.



**Figur 2.4.** Området for uttak av gjelleprøve til real-time RT-PCR.

Ved smitteforsøket vart og hud, thymus, pseudobranch, nasehole og hjarte tekne ut til histologi. Halve hjarte og ein analyseprøve av hjartevev vart og teke ut frå fisken frå kommersiell produksjon. I tillegg vart dei resterande gjellebogane tekne ut til mikrobiotiske og immunologiske undersøkingar. Vassprøvar vart og tekne ut ved både smitteforsøket og i felt. Ingen av desse prøvane vil inngå i denne oppgåva, men er ein del av FHF-prosjektet.

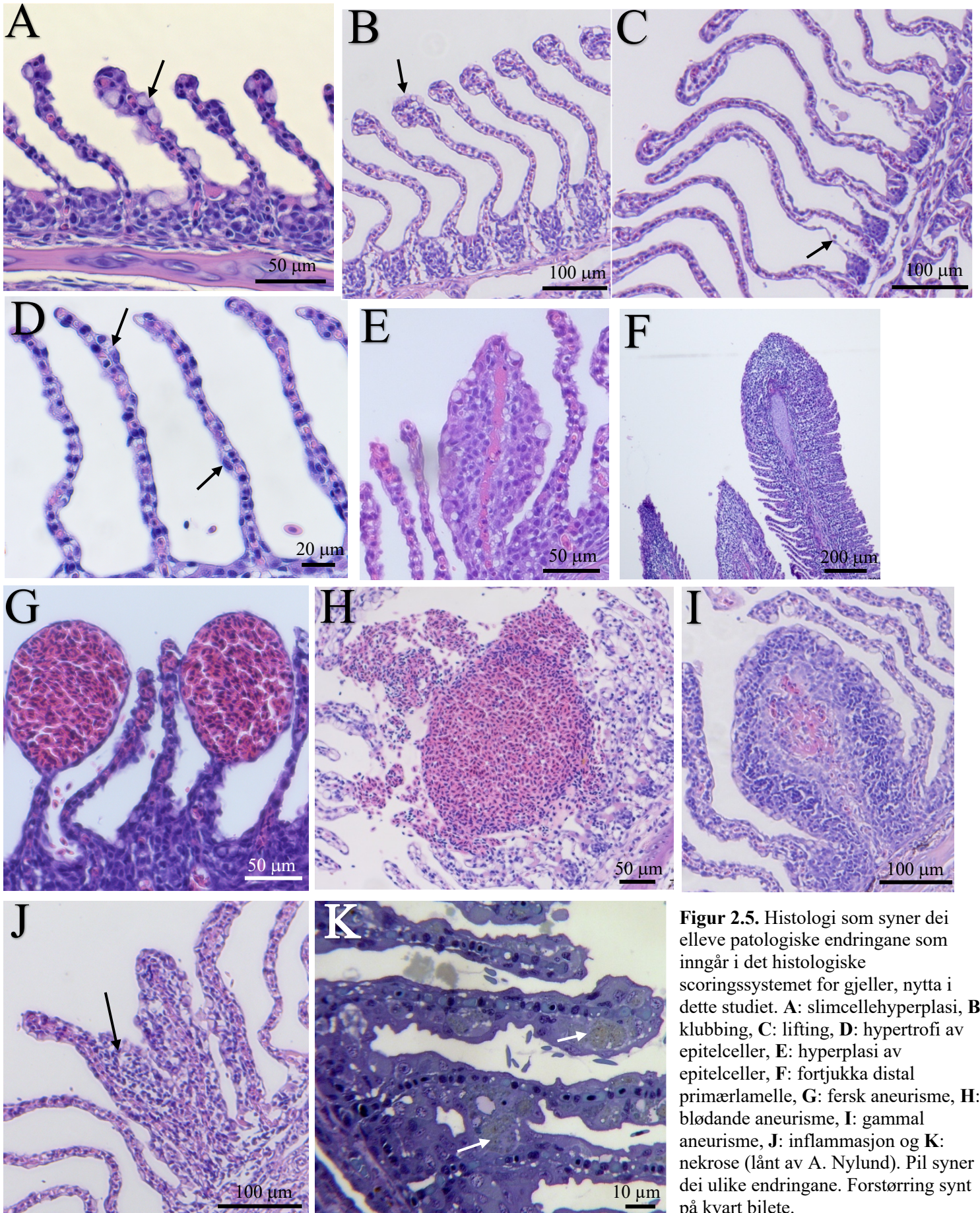
For å hindre kontaminering mellom fiskane i felt vart skalpell og pinsett skylde i vatn og tørka av mellom kvar fisk. I tillegg vart det nytta eigen skalpell og pinsett til å opne buken, slik at det utstyret som vart nytta til å ta ut dei aktuelle organa ikkje var i kontakt med noko anna. Prøvetakinga i samband med smitteforsøket vart gjort inne på laboratoriet, og her vart det nytta etanol og gassbrennar for å sterilisere utstyret mellom kvart individ.

## 2.4 Histopatologi

Dei formalin-fikserte gjellebogane vart sendt til Pharmaq Analytiq (Bergen) og vidare til Idexx sitt laboratorium i Wetherby (England) innan kort tid, for vidare arbeid. Vevsbetane vart støypt i parafin og behandla for histologisk analyse ved bruk av standardprosedyre (Gamble and Bancroft, 2008). Gjellene vart snitta med 2  $\mu\text{m}$  tjukkeleik før montering på poly-L-lysin-belagt slides (SuperfrostPlus, Thermo Scientific). Etter snitting vart veva farga med hematoksylin og eosin (HE) etter standard metode (Culling et al., 1985). Dei fysiske snitta vart sendt tilbake til UiB for undersøking.

Histologiske undersøkingar av gjellene vart gjort ved å score kvart snitt, med utgangspunkt i fem primærlameller. Scoringssystemet som vart nytta var ein forenkla versjon av eit scoringssystem for skader i gjeller, utvikla av Alf S. Dalum (Pharmaq Analytiq) i samband med dette FHF-prosjektet. Scoringssystemet bestod av elleve kjende og vanlege patologiske responsar i gjellevev, som fekk ein score frå 0-3 (figur 2.5). Score 0 er inga endring, 1 milde endringar, 2 moderate endringar og 3 omfattande endringar. I hovudsak vart dei ulike scorane gjevne på bakgrunn av førekomst i ein gitt prosentdel av det undersøkte vevet. Der score 1 vart gjeven dersom endringane vart observert i mindre enn 10 % av undersøkt vev, score 2 mellom 10-50 % og score 3 dersom endringa påverka meir enn 50 % av undersøkt vev. For slimcellehyperplasi vart derimot scoren sett utifrå kor mange slimceller det i gjennomsnitt vart observert per sekundærlamelle. Opp til 3 slimceller tilsvara score 1, mellom 5-8 slimceller tilsvara score 2 og over 8 slimceller tilsvara score 3. Fortjukka distal primærlamelle var score utifrå prosentdel av påverka primærlameller. Mindre enn 10 % av primærlamellene tilsvara score 1, 10 – 50 % tilsvara score 2 og meir enn 50 % tilsvara score 3.

Sidan ein låg prosentdel av det totale gjellevevet for kvar fisk vart undersøkt, vart gjennomsnittleg score for kvar endring blant fisk frå same uttak vektlagt. I tillegg vart eventuelle patogen registrert.



**Figur 2.5.** Histologi som viser dei elleve patologiske endringane som inngår i det histologiske scoringssystemet for gjeller, nytta i dette studiet. **A:** slimcellehyperplasi, **B:** klubbing, **C:** lifting, **D:** hypertrofi av epitelceller, **E:** hyperplasi av epitelceller, **F:** fortjukka distal primærlamelle, **G:** fersk aneurisme, **H:** blødande aneurisme, **I:** gammel aneurisme, **J:** inflammasjon og **K:** nekrose (lånt av A. Nylund). Pil viser dei ulike endringane. Forstørring synt på kvart bilete.

## 2.5 Deteksjon av patogen

### 2.5.1 RNA ekstraksjon

Ekstraksjon av total RNA er det fyrste steget i mange molekylære metodar, blant anna revers transkriptase polymerase kjedereaksjon (RT-PCR). RNA ekstraksjon vart gjort med TRIzol® Reagent (Life Technologies) etter protokollen til leverandøren, med nokre modifikasjonar. Fyrst vart prøvane tilsett 1 ml trizol og homogenisert i ein TissueLyser II (Qiagen) i 3 minutt med ein hastigheit på 30 1/s. Prøvane vart deretter inkubert 5 min i romtemperatur, før det vart tilsett 200 µl kloroform og blanda ved kraftig risting i 15 sekund før inkubering i nye 5 min i romtemperatur. Deretter vart prøvane sentrifugert ved 12 000 x g i 15 min ved 4 °C. Dette steget deler blandinga inn i tre ulike fasar, der det øvre laget er ein fargelause vassfasen som inneheld totalt RNA. Omlag 450 µl av vassfasen vart deretter blanda med 500 µl isopropanol. Etter 10 min inkubering i romtemperatur, vart prøvane sentrifugert ved 12 000 x g i 15 min ved 4 °C. Supernatanten vart deretter fjerna og pelletten vaska to gonger med 1 ml 75 % etanol fyrst og deretter 1 ml 100% etanol. Etter at etanolen var tilsett, vart pelletten vaska på alle sider ved vortex før sentrifugering ved 12 000 x g i 5 min ved 4 °C. Etanolen vart helt ut og 100 % etanol tilsett, før vortex og ny sentrifugering i 5 min. Etanolen vart fjerna og pelletten tørka i omlag 5-10 min, til alkoholen hadde fordampa. Til slutt vart pelletten løyst opp i 50-100 µl 70 °C RNase-fritt vatn, avhengig av storleiken på pelletten. Ein negativ renskontroll vart inkludert ved kvar ekstraksjon. Den negative kontrollen følgde den same protokollen som vevsprøvane, men utan at det var vev til stades i prøven. Prøvane vart fryst ned rett etter at pelletten var løyst i RNase-fritt vatn, og lagra ved -25 °C til vidare prosessering innan kort tid.

RNA-konsentrasjonen (ng/µl) i prøven vart målt ved å nytta eit spektrofotometer (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific). Konsentrasjonen og reinsemda vart målt for alle prøvane, i tillegg til renskontrollane.



## 2.5.2 Real-time RT-PCR

Det ekstraherte RNAet vart analysert med real-time RT-PCR for å påvise RNA frå spesifikke mikroparasittar. Real-time RT-PCR vart utført ved bruk av AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagent kit frå Applied Biosystems. One-step kitet gjer det mogeleg å køyre både revers transkripsjon og PCR-reaksjonen i same rør. Real-time RT-PCR registrerer amplifikasjonen av måltemplatet i sanntid under reaksjonen. Grunna bruk av eit fluorescensmolekyl som vert frigjort når proben bind spesifikke sekvensar er det mogeleg å observere mengda måltemplat for kvar syklus. Fluorescenssignalet aukar proporsjonalt med mengda replikert cDNA. Ein kan derfor sjå kor mange amplifikasjonssyklusar det tek før ein når ein bestemt terskel, som i dette studiet er satt til 0.1 for alle assaya. Ct-verdien er antall syklusar det tek for at fluorescenssignalet skal nå den bestemte terskel-verdien. Ein vil få ein låg Ct-verdi dersom det er mykje måltemplat i prøven. Ein høg Ct-verdi vil indikere lite måltemplat.

Prøvane vart fordelt i eit brønnbrett (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems). Det vart fyrst tilsett 10,5 µl reaksjonsmiksk i kvar brønn. Reaksjonsmiksen bestod av 6,25 µl 2x-RT-PCR buffer, 1,0 µl (sluttkonsentrasjon 800 nM) av både forward og revers primer, 0,22 µl (sluttkonsentrasjon 175 nM) probe, 0,25 µl enzym mix og 1,78 µl vatn. Deretter vart det tilsett 2 µl templat i kvar brønn. Det var i tillegg ein rensekontroll og ein NTC (non template control) for kvart assay på brettet. Rensekontrollen vart nytta for å detektere ein eventuell kontaminering under RNA-ekstraksjonen. NTC vart brukt som ein kontroll for potensiell kontaminering av real-time RT-PCR reagensane. Brønnane vart forseгла med MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems), før plata vart sentrifugert i 15 sekund og kjørt i QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System. Reaksjonen startar med revers transkripsjon i 10 min på 45 °C. Dette transkriberer RNA til cDNA som er utgangspunktet for PCR-reaksjonen. Deretter vart temperaturen auka til 95 °C i 10 min. Dette denaturerer og inaktiverer revers transkriptasen i tillegg til å aktivere DNA-polymerasen. Til slutt har ein amplifikasjon av måltemplatet gjennom 45 syklusar beståande av to trinn, først ved 95 °C i 15 sekund, deretter ved 60 °C i 45 sekund.

Gjelle- og nyreprøvar vart køyrd mot ei rekkje ulike assay, lista i tabell 2.2. Elongeringsfaktor 1 alfa (EF1A) vart nytta som referansegen (intern kontroll) for altantisk laks (Olsvik et al., 2005). For regnbogearen vart Regnbogeare elongeringsfaktor 1 alfa (OmELF) nytta som referansegen (Are Nylund, pers. kom.). Gjelleprøvane frå smitteforsøket vart testa mot assaya

TB-tuf, SGPV, ILAV, *PRV*, Costia, Epi og Pch. Oversikt over assaya gjelle- og nyreprøvene frå dei tre lokalitetane vart testa mot, er lista i tabell 2.3.

**Tabell 2.2.** Primera og TaqMan probar som vart nytta for å detektere bestemte mikroparasittar ved bruk av real-time RT-PCR. Effektiviteten for assaya er gjevne i dei lista publikasjonane.

Assay	Primer	Sekvens	Referanse
<b>Infeksiøs lakseanemivirus (Segment 7)</b>	Probe Forward Revers	CAC ATG ACC CCT CGT C TGG GAT CAT GTG TTT CCT GCT A GAA AAT CCA TGT TCT CAG ATG CAA	Plarre et al., 2005
<b>Salmonid gjellepoxvirus (POX MCP)</b>	Probe Forward Revers	TTA TAC ACC ATC ACA TTT GTG CAG AGG TTT TTC ATA CGC CAG AA GAG GTC ACG GTG ATG ACA GAA C	A. Nylund, pers. kom.
<b>Salmonid alfavirus (nsP1)</b>	Probe Forward Revers	CTG GCC ACC ACT TCG A CCG GCC CTG AAC CAG TT GTA GCC AAG TGG GAG AAA GCT	Hodneland og Endresen, 2006
<b>Piscin myokardittvirus (PMCV)</b>	Probe Forward Revers	TGG TGG AGC GTT CAA AGG GAA CAG GAG GAA GCA GAA CGT AAT CCG ACA TCA TTT TGT GA	Nylund et al., 2018a
<b>Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV)</b>	Probe Forward Revers	TCT TGG CCC CGT TCA TT ACC CCA GGG TCT CCA GTC GGA TGG GAG GTC GAT CTC GTA	Watanabe et al., 2006
<b>Piscin orthoreovirus 1 (PRV1-M2)</b>	Probe Forward Revers	CTG GCT CAA CTC TC CAA TCG CAA GGT CTG ATG CA GGG TTC TGT GCT GGA GAT GAG	Nylund et al., 2018a
<b>Piscin orthoreovirus 3 (PRV3-S1)</b>	Probe Forward Revers	CGA AGY ATA ATG AAG A GCG ACG CCT TAG AGA CAA CA CRA GAT CAC CAG TGG TCT TT	A. Nylund, pers. kom.
<b>Salmonid herpesvirus 4 (AHsal gly 4)</b>	Probe Forward Revers	ATT CTG GTG CGG ATT T CGG TCG CCA GAG CAT TTC T CTA TGC CGT GCG GTG TGA T	A. Nylund, pers. kom.
<b>Atlantisk laksecalicivirus (ASCV)</b>	Probe Forward Revers	AYC CGA AGG AGG TYT CCG CCW TAY GYC YRS TTC CCA GCC RSS CKR TTR TAK TC	A. Nylund, pers. kom.
<b>Piscin novirhabdovirus (VHSV)</b>	Probe Forward Revers	CTC ACA GAC ATG GG TGT CCG TKC TTC TCT CCT ATG TAC T GCC CTG RCT GMC TGT GTC A	Duesund et al., 2010
<b>Candidatus Branchiomonas cysticola (Epi)</b>	Probe Forward Revers	ACT TAG CGA AAG TTA AGC GAG TAA TAC ATC GGA ACG TGT CTA GTG CTT TCC TCT CCC AAG CTT ATG C	Nylund et al., 2018a
<b>Candidatus Piscichlamydia salmonis (Pch)</b>	Probe Forward Revers	CAA AAC TGC TAG ACT AGA GT TCA CCC CCA GGC TGC TT GAA TTC CAT TTC CCC CTC TTG	Nylund et al., 2008
<b>Yersinia ruckeri (YR)</b>	Probe Forward Revers	TAA TAG CAC TGA ACA TTG AC GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG CGG TGC TTC TTC TGC GAG TAA	A. Nylund, pers. kom.
<b>Tenacibaculum spp. (Tb-tuf)</b>	Probe Forward Revers	TTT CAA TAC ATA CAC CTC AGC AGT GTG ACG TCC ACC TT CTG TAA GCC AGG TTC TGT	Småge et al., 2017
<b>Tenacibaculum maritimum (Tmar-ompA)</b>	Probe Forward Revers	TGA ATC AAA TGC GAT CTT GCC AAT AGC AAC GGG ATA CC TCG TGC GAC CAT CTT TGG T	Frisch et al., 2018
<b>Aeromonas sobria (Asobria)</b>	Probe Forward Revers	TCT GTC AGC TGT GAC GTT GGA GGA AAG GTT GGC AGC TAA T ACG GAG TTA GCC GGT GCT T	A. Nylund, pers. kom.
<b>Pasturella spp. (Pasteur)</b>	Probe Forward Revers	Konfidensielt	S. Nylund (Pharmaq Analytiq)

<b><i>Candidatus Clavichlamydia salmonicola</i></b> (Ach)	Probe Forward Revers	CGT GAC AGC GAT AGA G AGA ACC TTA CCC AGA TTT GAC ATG T CCT GTC CTT TCG GAA GAC GAT	Nylund et al., 2011
<b><i>Candidatus Syngnamydia salmonis</i></b> (SCh)	Probe Forward Revers	TCC TTC GGG ACC TTA C GGG TAG CCC GAT ATC TTC AAA GT CCC ATG AGC CGC TCT CTC T	Nylund et al., 2014
<b><i>Paranucleospora theridion</i></b> (Nuc)	Probe Forward Revers	TTG GCG AAG AAT GAA A CGG ACA GGG AGC ATG GTA TAG GGT CCA GGT TGG GTC TTG AG	Nylund et al., 2010
<b><i>Paramoeba perurans</i></b> (Pperu)	Probe Forward Revers	CTG GTT CTT TCG RGA GC GAT AAC CGT GGT AAA TCT AGA GCT AAT A TGG CAT TGG CTT TTG AAT CT	Nylund et al., 2018b
<b><i>Paramoeba pemaquidensis</i></b> (Ppemq)	Probe Forward Revers	GAC TGC TYT CGR GTA GG GAT AAC CGT GGT AAA TCT AGA GCT AAT A TGG CAT TGG CTT TTG AAT CT	A. Nylund pers. com
<b><i>Ichthyobodo</i> spp.</b> (Costia)	Probe Forward Revers	TCC ACG ACT GCA AAC GAT GAC G ACG AAC TTA TGC GAA GGC A TGA GTA TTC ACT YCC GAT CCA T	Isaksen et al., 2012
<b><i>Parvicapsula pseudobranchicola</i></b> (Parvi)	Probe Forward Revers	CCG TAT TGC TGT CTT TGA TCG TAG TCG GAT GAC AAG AAC GT AAA CAC CCC GCA CTG CAT	Nylund et al., 2011
<b><i>Paramoeba</i> spp.</b> (Neo-ny)	Probe Forward Revers	ATG AAA GAC GAA CTT CTG TTG TCA GAG GTG AAA TTC TTG GAT T TGA AAA CAT CTT TGG CAA ATG C	A. Nylund pers. com
<b>X-celle-liknande parasitt</b> (PER)	Probe Forward Revers	AGC GTT GAG CGG AT CCC TGC TAA ATA GTA TGC GGT ATA CA ACC TTC AAA ATA AGA ACA ATC AGC AA	A. Nylund pers. com
<b><i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i></b> (PKX)	Probe Forward Revers	TGT TGT TAG GAT ATT TTC C CAA GAT CGC GCC CTA TCA AT CGT CAC CCG TTA CAA CCT TGT	A. Nylund pers. com
<b>Atlantisk laks elongeringsfaktor</b> (EF1A)	Probe Forward Revers	ATC GGT GGT ATT GGA AC CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA CAC ACG GCC CAC AGG TAC A	Olsvik et al., 2005
<b>Regnbogeure elongeringsfaktor</b> (OmELF 1 alfa)	Probe Forward Revers	ATC GGC GGT ATT GGA AC CCC CTC CAG GAT GTC TAC AAA CAC ACG GCC CAC GGG TAC T	A. Nylund pers. com

**Tabell 2.3.** Oversikt over kva assay dei ulike prøveuttaka frå kommersiell produksjon vart testa mot. Kryss syner at alle prøvane frå uttaket vart analysert med assayet. Svart kryss = analyserte gjelleprøvar og oransje kryss = analyserte nyreprøvar.

Assay	Lokalitet-A			Lokalitet-B			Lokalitet-C			
	Før	Død	Etter	Før	Død	Etter	Før	Død	S etter	F etter
ILAV s7	XX	XX	XX	XX	XX	XX	X	X	X	X
POX	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	X
nsP1	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
PMCV	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
IPNV	X	X	X	X	X	X	XX	XX	XX	XX
PRV1-M2	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
PRV3-S1							XX	XX	XX	XX
AHsal gly4		X	X	X	X	X				
ASCV	X	X	X	X	X	X				
VHSV							XX	XX	XX	XX
Epit	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Pch				X	X	X	X	X	X	X
Ach				X	X	X	X	X	X	X
Sch				X	X	X	XX	XX	XX	XX
Yersinia	X	X	X	XX		XX				
Tb-tuf	XX	XX	XX	XX	X	XX	XX	XX	XX	XX
Tmar	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Asobria		X	X	X	X	X				
Pasteur	X	X	X							
Nuc	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Pperu	X	X	X	X	XX	X	XX	XX	XX	XX
Ppemq				X	X	X	X	X	X	X
Costia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Parvi	X	X	X	X	X	X				
Neo-ny				X		X				
PER					X		XX	XX	XX	XX
PKX							XX	XX	XX	XX

### 2.5.3 Effektivitetstest av real-time RT-PCR assay

Dei fleste assaya var både optimalisert og effektivitetstesta på førehand, og dei konsentrasjonane og verdiane vart nytta i dette studiet. Elongeringsfaktoren til regnbogeare (OmELF) og assayet mot X-celle liknande parasitt (PER) hadde ikkje kjend effektivitet. Effektiviteten til desse to assaya vart testa ved å analysere ei fortynningskurve med templat i triplikat. Fortynningsserien bestod av åtte punkt ( $10^0$ - $10^8$ ). Ct-verdiane for kvar triplikat vart plotta inn i ei standardkurve for å finne stigningstalet og regresjonstalet ( $R_2$ ) til assayet. Dette legg grunnlaget for utrekning av effektiviteten (E) med følgende formel (1):

$$1) E = 10^{(-1)/\text{stigningstal}}$$

## 2.6 Densitet

Densitet seier noko om kor infisert kvar enkelt fisk er av eit bestemt patogen. Det kan dermed nyttast som eit mål på tettleiken av eit bestemt patogen i kvar enkelt fisk. I dette studiet vart det nytta til å gje eit inntrykk av mengda spesifikt RNA frå ein bestemt patogen i prøven. Densiteten i denne oppgåva er uttrykt på to ulike måtar, både som normalisert uttrykk (NE) og som reverse Ct-verdiar.

### 2.6.1 Utrekning av normalisert uttrykk

Resultata frå real-time RT-PCR vart normalisert mot referanseggen, EF1A for atlantisk laks og OmELF for regnbogeaure, for å korrigere eventuelle forskjellar i mengde vev i analyseprøven. Normalisert uttrykk (NE) vart rekna ut ved bruk av formel (2). Der  $E_{ref}$  er effektiviteten til elongeringsfaktoren og  $Ct_{ref}$  er Ct-verdien for elongeringsfaktoren.  $E_{mål}$  og  $Ct_{mål}$  er effektiviteten for det aktuelle patogenet som skal normaliserast med tilhøyrande Ct-verdi. Negative prøvar vart ikkje teke med.

$$2) NE_{Gjellevev} = \frac{(E_{ref})^{Ct_{ref}}}{(E_{mål})^{Ct_{mål}}}$$

Dei normaliserte verdiane vart vidare rekna om til NE-fold, for å seie noko om variasjonen mellom prøvane. Dette vart gjort ved å sette det normaliserte uttrykket (NE) opp mot den lågaste  $NE_{min}$  for gjelle- og nyrevev ved kvar lokalitet, ved bruk av formel (3).

$$3) NE_{fold} = \frac{NE}{NE_{min}}$$

Det var stor variasjon ved bruk av NE-fold, derfor vart alle data log-transformert, for å gje eit betre bilete av mengda patogen ved kvart uttak.

### 2.6.2 Reverse Ct-verdiar

For ein betre framstilling av Ct-verdiane vart dei reversert ved bruk av formel (4). Det vil seie at høge verdiar (låge Ct-verdiar) indikerar høg densitet. Denne utrekninga vert berre nytta når Ct-verdiane til elongeringsfaktoren var tilnærma stabile. Negative prøvar vart framstilt som 0 ved reverse Ct-verdiar.

$$4) \text{ Densitet} = 40 - \text{Ct verdi}$$

## 2.7 Prevalens

Prevalens er andelen av ein populasjon som er infisert med eit spesifikt patogen, dette vert ofte oppgjeve i prosent og rekna ut med formel (5). Dette vil gje ein indikasjon på utbreiinga av ein mikroparasitt i den testa populasjonen.

Analyse av 30 fisk vil påvise ein prevalens på 10 % i den undersøkte populasjonen med eit sikkerheitsnivå (konfidensintervall) på 95 %. Analyse av 60 fisk vil påvise ein prevalens på 5 % (med 95 % sikkerheitsnivå) i ein populasjon > 1 000 000 individ.

$$5) \text{ Prevalens (\%)} = \frac{\text{Antall positive prøvar}}{\text{Totalt antall prøvar}} \times 100$$

## 2.8 Diversitetsindeks

Diversitetsindeks vart nytta for å beskrive kor mange ulike mikroparasittar det er i ein individuell fisk og i ein populasjon. Diversitetsindeksen vart funne ved bruk av formel (6), og uttrykt frå 1-10. Kwart uttak vart analysert mot ulikt antall assay, og antall patogen analysert for vil derfor variere mellom uttaka (sjå tabell 2.3).

$$6) \text{ Diversitetsindeks} = \frac{\text{Antall patogen til stades}}{\text{Antall patogen analysert for}} \times 10$$

## 2.9 Statistikk

NE-fold verdier vart nytta til å utføre statistiske analysar for å undersøke endringar i densitet av patogen mellom uttaka. Statistiske analysar vart gjort på MNE-fold av positive individ for kvart uttak. NE-fold verdiane var ikkje normalfordelt. Derfor vart den ikkje-parametriske testen Kruskal-Wallis nytta ved samanlikning av fleire prøvar, følgt av ein Dunn's post-hoc multiple samanlikningstest. Ved statistiske analysar for å undersøke endring i gjennomsnittleg antall lakselus per fisk før og etter behandling under smitteforsøket, var verdiane normalfordelt. Derfor vart det nytta ein One-way ANOVA test, følgt av ein Tukeys's multiple samanlikningstest.

P-verdi < 0,05 vert sett på som signifikant for alle statistiske analysar. Resultata vert skrivne som \* =  $P \leq 0,05$ , \*\* =  $P \leq 0,01$ , \*\*\* =  $P \leq 0,001$  og \*\*\*\* =  $P \leq 0,0001$ . Programmet GraphPad Prism 8 for Mac OS X, versjon 8.3 vart brukt for alle statistiske analysar, og for å lage alle grafar.

### 3 Resultat

Registrerte miljøfaktorar (temperatur, oksygen og salinitet), patologi, kartlegging av mikroparasittar, histologiske endringar og mortalitet hos fisken før, under og etter behandling med varmt vatn mot lakselus er presentert nedanfor.

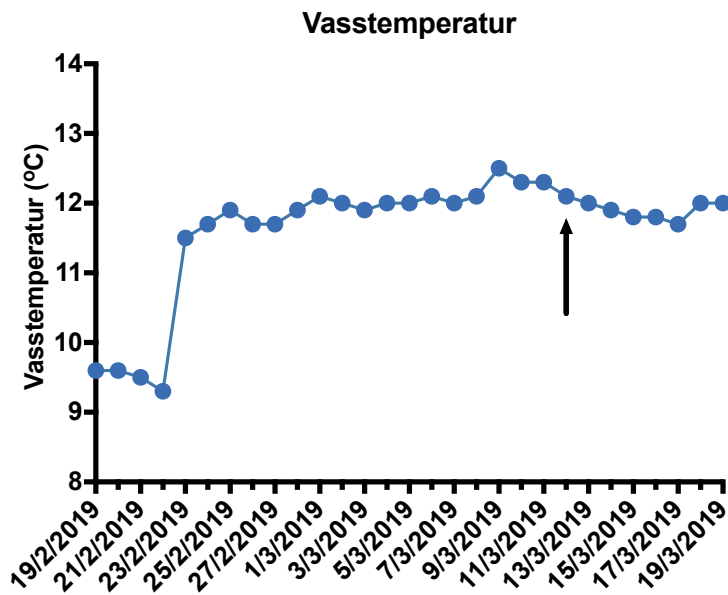
325 gjelleprøvar og 265 nyreprøvar vart analysert ved bruk av real-time RT-PCR i dette studiet. Dette for å kartleggje kva patogen som var tilstades på fisken og kva belastinga av desse var ved tre tidspunkt i samband med eit smitteforsøk og tre avlusingar i kommersiell produksjon. I tillegg vart totalt 350 gjellebogar scora for histologiske endringar ved bruk av eit gjellescoringssystem utvikla i samband med dette studiet.

Etter gjennomgang av resultatata frå smitteforsøket vil resultatata frå kvar enkelt avlusing i kommersiell produksjon (A, B og C) bli presentert.

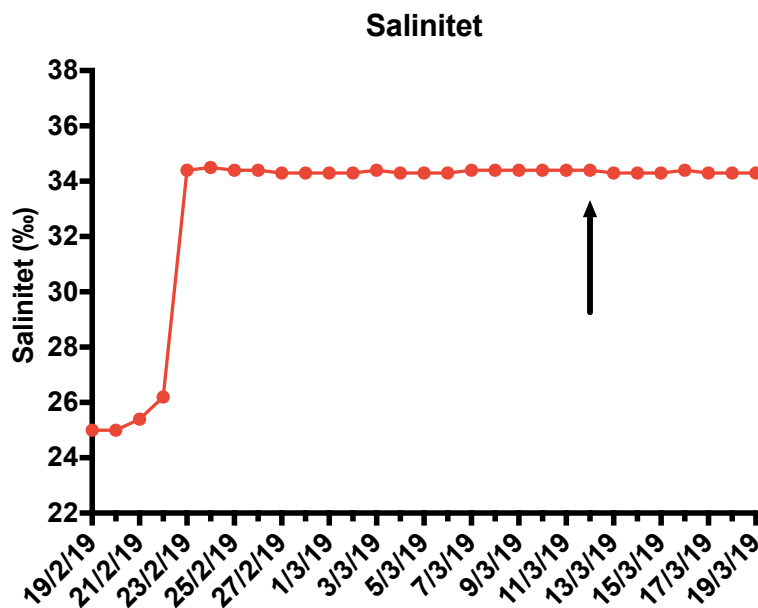
## 3.1 Smittforsøk

### 3.1.1 Abiotiske faktorar

Alle miljøfaktorar vart prøvd haldne konstante gjennom heile forsøket. Fisken gjekk på eit 12:12 lysregime. Etter ei akklimatiseringstid på tre dagar var vass temperaturen  $11,9 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  (figur 3.1) og saliniteten  $34,3 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{‰}$  (figur 3.2). Gjennomstrauminga i alle kara var 850 liter/time. Fisken vart røkta dagleg, for å sikre god fiskevelferd i kara.



Figur 3.1. Registrert temperatur gjennom heile forsøket. Pil syner behandlingstidspunktet.



Figur 3.2. Registrert salinitet gjennom heile forsøket. Pil syner behandlingstidspunktet.



### 3.1.2 Biotiske faktorar

Det vart registrert varierende grad av kjeveerosjon hos dei fleste fiskane i alle kara ved det fyrste uttaket. Dei fleste av desse med lett erosjon på underkjeven. Åtte fisk døydde under forsøket. Dei tre fyrste same dag som fisken vart smitta med lus, men ingen av desse fiskane vart smitta (to stk frå kar-1 og ein frå kar-3). Tre dagar etter behandlinga vart to svimara avliva, begge var smitta og behandla (ein frå kar-5 og ein frå kar-6). Dagen etter døydde det ein fisk frå kar-5 (smitta og behandla), og seks dagar etter behandlinga døydde det ein fisk og ein svimar vart avliva frå kar-6 (smitta og behandla). Gjennomsnittslengda og vekta for dei ulike kara ved kvart prøveuttak er lista i tabell 3.1.

**Tabell 3.1.** Gjennomsnittslengd og vekt ved prøveuttak ein dag før behandling (11.03.2019), ein dag etter behandling (13.03.2019) og sju dagar etter behandling (19.03.2019), N=10 fisk per kar per uttak. Kar-1 er kontrollgruppe, kar-2 og kar-4 er smitta men ubehandla, kar-3 er ikkje smitta men behandla og kar-5 og kar-6 er smitta og behandla.

	Før behandling		1d etter behandling		7d etter behandling	
	Vekt (gram)	Lengde (cm)	Vekt (gram)	Lengde (cm)	Vekt (gram)	Lengde (cm)
<b>Kar-1</b>	240,5	27,3	237,1	27,4	228,4	26,7
<b>Kar-2</b>	229,4	26,9	235,3	27,2	245,9	27,5
<b>Kar-3</b>	245,6	27,4	219,7	26,6	245,5	27,4
<b>Kar-4</b>	242,8	27,0	239,8	27,2	261,9	27,7
<b>Kar-5</b>	235,5	27,0	217,0	26,5	249,0	27,6
<b>Kar-6</b>	219,1	26,5	255,8	27,8	239,7	27,0

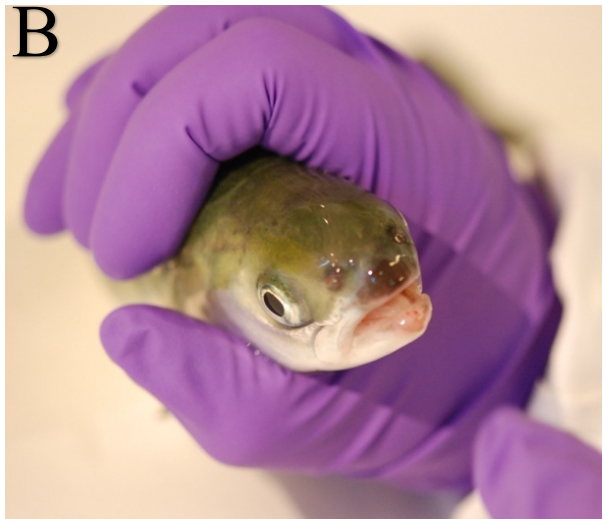
### 3.1.3 Behandling med varmt vatn

Ved behandling i 34 °C sjøvatn heldt laksen seg roleg i håven dei fyrste 10 sekunda, medan den dei siste 20 sekunda sprella svært mykje. Fisken roa seg med ein gong den vart overført til normal temperatur etter behandlinga. Under behandling vart det danna store mengda skum i behandlingskaret (figur 3.3). Fisken i tre kar vart behandla (kar-3, kar-5 og kar-6), der dei to siste kara var smitta med lus. Under behandling av desse kara fall det av totalt 250 lus i kar-5, og 348 lus i kar-6. Kjeveerosjonen som vart observert under det fyrste prøveuttaket, vart og registrert ved uttak 2 og 3, i noko større grad (figur 3.4A). Det vart og observert svarte snutar på fisken i dei behandla kara ved prøveuttak ein dag etter behandling (figur 3.4B). I karet som ikkje var smitta (kar-3), vart det observert svarte snutar hos 5 av 10 fiskar. Medan det i dei to smitta kara (kar-5 og kar-6) vart registrert 9 av 10 og 10 av 10 fiskar med svarte snutar. Ved uttaket sju dagar etter behandling vart det ikkje registrert svarte snutar hos nokon av fiskane. Utanom dette vart det registrert lite patologi på fisken.

Dei to svimarane som vart tekne ut frå dei to smitta og behandla kara (kar-5 og kar-6) tre dagar etter behandlinga, hadde noko meir synleg patologi samanlikna med resten av fisken. Fisken frå kar-5 hadde katarakt i begge augene, i tillegg til blødning i det eine og utståande skjel. Svimaren frå kar-6 hadde eit stort sår bak feittfinna og eit på hovudet. Dei hadde henholdsvis 4 og 10 mobile lakselus på seg.

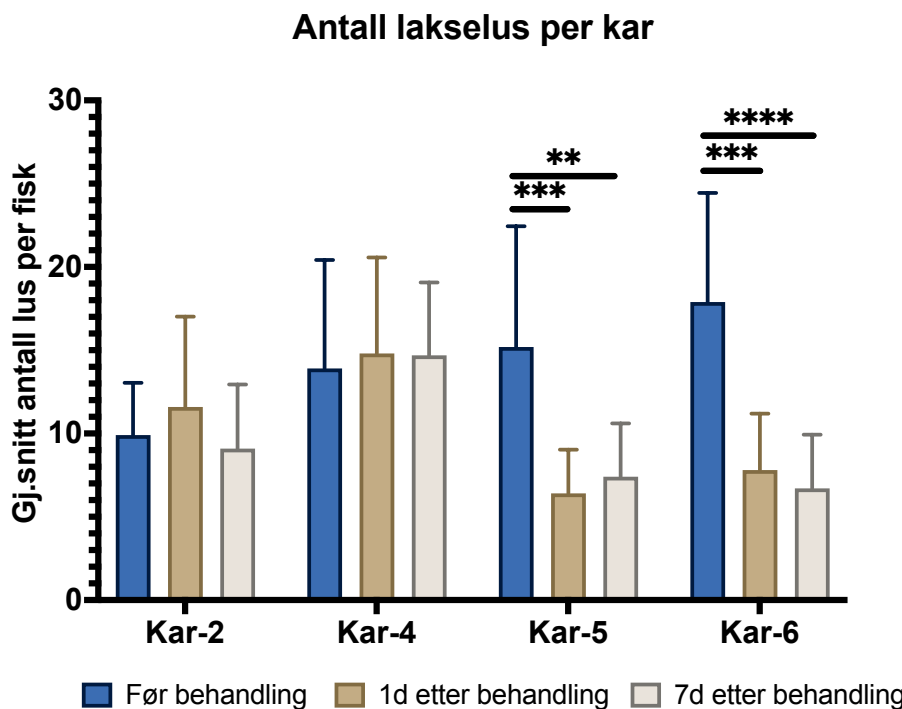


**Figur 3.3.** Behandlingskaret (34 °C og 34 ‰) med skum etter behandling.



**Figur 3.4. A:** Fisk med blodig kjeveerosjon og blødning i auge sju dagar etter behandling med 34 °C sjøvatn. **B:** Fisk med svart snute ein dag etter behandling med 34 °C sjøvatn.

Antallet mobile lakselus på smitta laks i dei behandla kara, vart signifikant redusert etter behandling med 34 °C sjøvotn (Kar-5: 1 dag etter  $P \leq 0,001$  og 7 dagar etter  $P \leq 0,01$ . Kar-6: 1 dag etter  $P \leq 0,001$  og 7 dagar etter  $P \leq 0,0001$ ) (figur 3.5). I kar-5 vart gjennomsnittleg antall lus redusert frå 15,2 før behandling til 6,4 og 7,4 ved dei to prøveuttaka etter behandling (Ein dag og sju dagar etter). I kar-6 vart gjennomsnittleg antall lakselus redusert frå 17,9 før behandling, til 7,8 og 6,7 ved dei to påfølgjande uttaka. I dei to smitta, men ubehandla, kara var antallet lakselus stabilt gjennom heile forsøket.

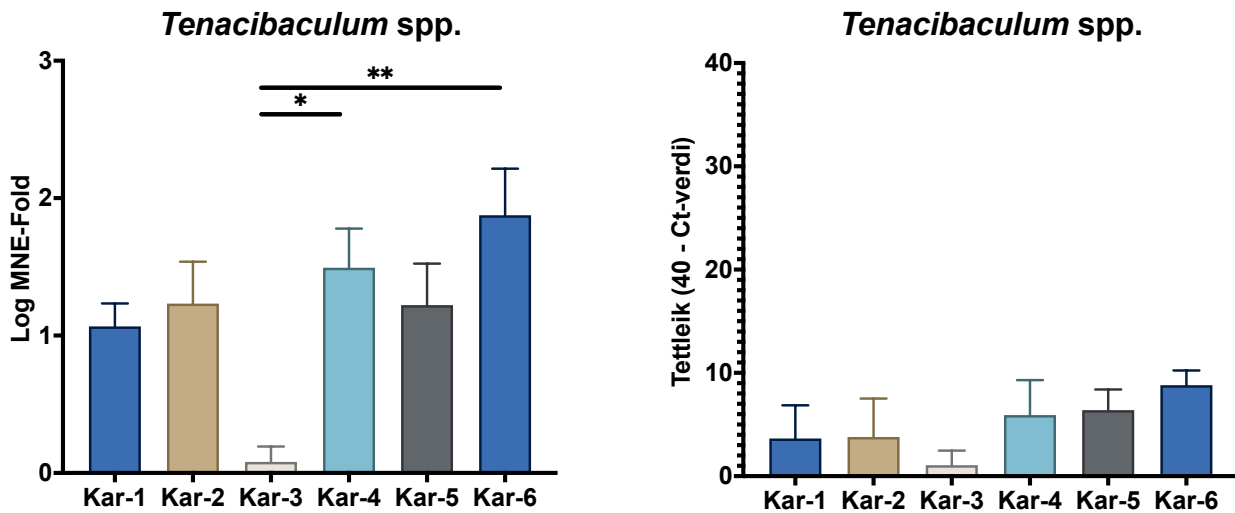


**Figur 3.5.** Gjennomsnittleg antall mobile lakselus per fisk (N=10 fisk per kolonne) i kvart kar ved dei tre prøveuttaka. Kar-5 og kar-6 er behandla med 34 °C sjøvotn, kar-2 og kar-4 er ubehandla. Kar-1 og kar-3 var ikkje smitta med lus, og derfor ikkje med i figuren. \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  og \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

### 3.1.4 Kartlegging av mikroparasittar

For å sikre at fisken nytta i forsøket var patogenfri, vart gjelleprøvane frå det siste uttaket (N=60) nytta til real-time RT-PCR analyse for å kartleggje eventuell førekomst av patogen. Alle 60 gjelleprøvane var negative for virusa Salmonid gjellepoxvirus (SGPV), *Piscin orthoreovirus* (PRV) og Infeksiøs lakseanemivirus (ILAV).

44 av dei 60 analyserte gjelleprøvane var positive for *Tenacibaculum* spp. Ct-verdiane for alle dei positive prøvane var over 30, med unntak av tre fiskar frå kar-6 (smitta og behandla) som hadde Ct-verdiar ned mot 28,9. Dette indikerer ei låg mengde måltemplat i prøven og derfor lite bakterie. Figur 3.6 syner ulikskap i densitet mellom dei ulike kara. Signifikant lågare densitet av *Tenacibaculum* spp. i kar-3 samanlikna med kar-4 og kar-6 (Kar-4  $P \leq 0,05$  og kar-6  $P \leq 0,01$ ).



**Figur 3.6.** Gjennomsnittleg densitet av *Tenacibaculum* spp. detektert i gjeller ved siste prøveuttak. Data er presentert som Log MNE-fold av positive prøvar og reverse Ct-verdiar (40 – Ct-verdi). I figuren til høgre er negative prøvar uttrykt som 0. Feilfelte syner standardavvik (SD) mellom prøvane. Kar-1 er kontrollgruppe, kar-2 og kar-4 smitta men ubehandla, kar-3 er ikkje smitta men behandla og kar-5 og kar-6 er smitta og behandla. Prevalensen er henholdsvis 60, 60, 40, 80, 100 og 100 % for dei ulike kara. N= 10 for alle kara. \*  $P \leq 0,05$  og \*\*  $P \leq 0,01$ .

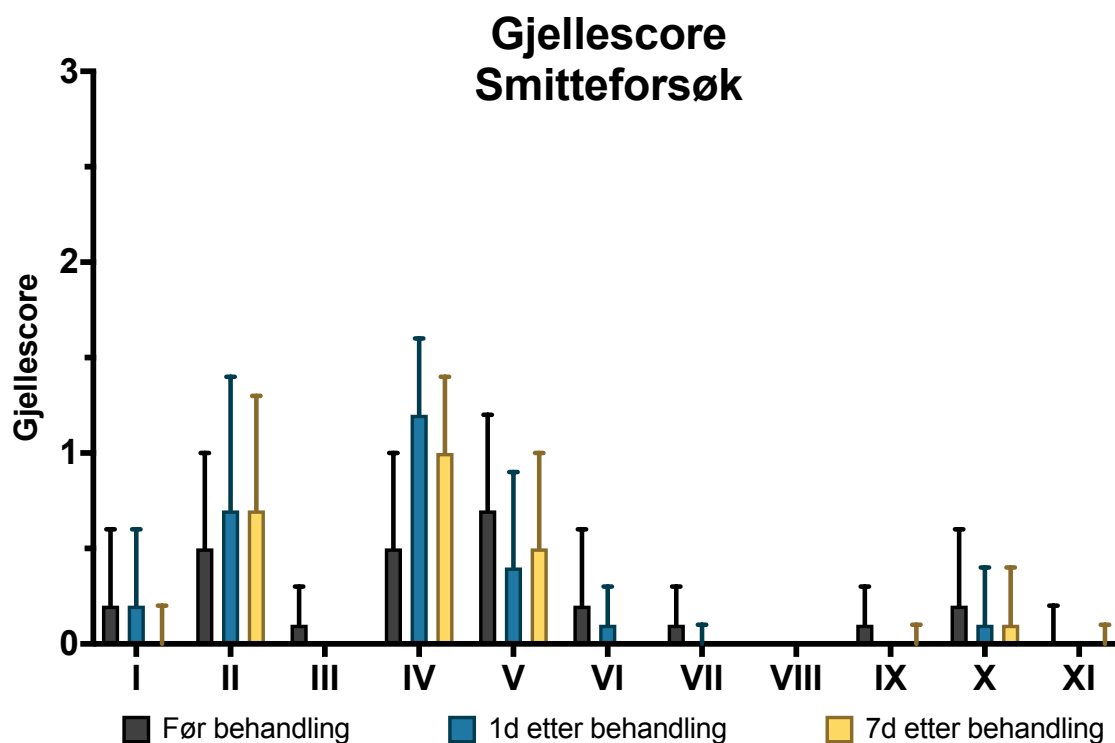
Analysar mot ektoparasitten *Ichthyobodo salmonis* og bakteriane *Candidatus Branchiomonas cysticola* og *Candidatus Piscichlamydia salmonis* gav negative resultat for alle dei 60 analyserte gjelleprøvane, med unntak av seks individ frå kar-4, kar-5 og kar-6 (tabell 3.2). Ct-verdien for dei seks fiskane var alle over 34.

**Tabell 3.2.** Påvising av *Ichthyobodo salmonis* i ein fisk, *Candidatus Piscichlamydia salmonis* i fire fiskar og *Candidatus Branchiomonas cysticola* i ein fisk. Fisken frå kar-4 var smitta med copepodittar men ikkje behandla, medan fisk frå kar-5 og kar-6 var smitta og behandla med varmt vatn. Vekt, lengde og Ct-verdi for dei ulike fiskane er oppgitt.

	Status	Vekt	Lengde	Patogen	Ct-verdi
<b>Kar-4</b>	Smitta og ubehandla	262,6	28,0	<i>Ichthyobodo salmonis</i>	35,8
<b>Kar-5</b>	Smitta og behandla	245,2	27,5	<i>Cand. P. salmonis</i>	34,8
<b>Kar-5</b>	Smitta og behandla	240,9	27,5	<i>Cand. P. salmonis</i>	34,8
<b>Kar-5</b>	Smitta og behandla	227,5	26,5	<i>Cand. P. salmonis</i>	36,4
<b>Kar-6</b>	Smitta og behandla	180,7	24,5	<i>Cand. P. salmonis</i>	35,9
<b>Kar-6</b>	Smitta og behandla	239,8	27,0	<i>Cand. B. cysticola</i>	35,8

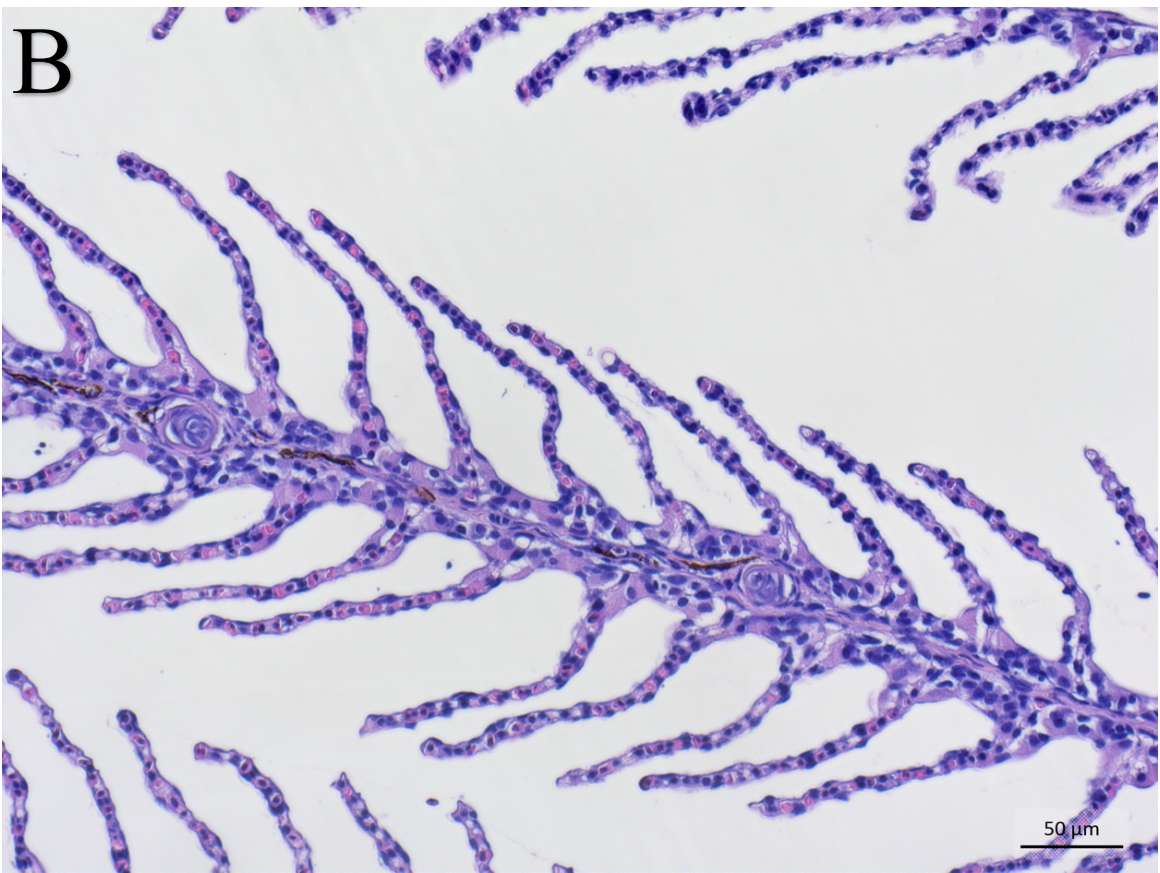
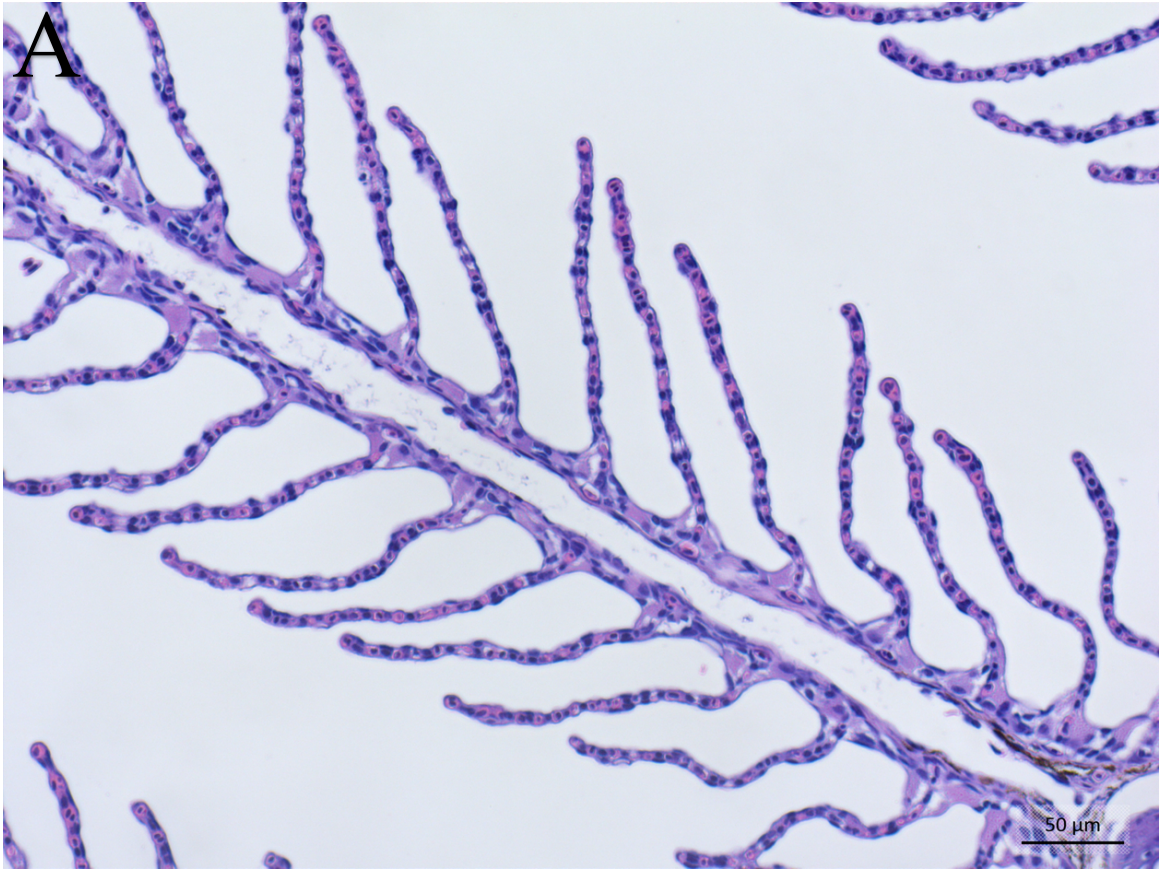
### 3.1.5 Histopatologi

I hovudsak var det klubbing, og hypertrofi og hyperplasi av epitelceller med score 1 som vart registrert ved alle tre uttaka (figur 3.7). Enkelt fisk fekk score 2 på klubbing og hypertrofi. Kar 4-6 (Kar-4: smitta og ubehandla, kar-5 og -6: smitta og behandla) fekk ein noko høgare score på hyperplasi og hypertrofi av epitelceller og inflammasjon, samanlikna med dei tre andre kara, utanom det var det ingen tydeleg ulikheit mellom dei seks kara. Med unntak av hypertrofi av epitelceller, var det ingen utvikling av gjellescore etter behandling med varmt vatn.



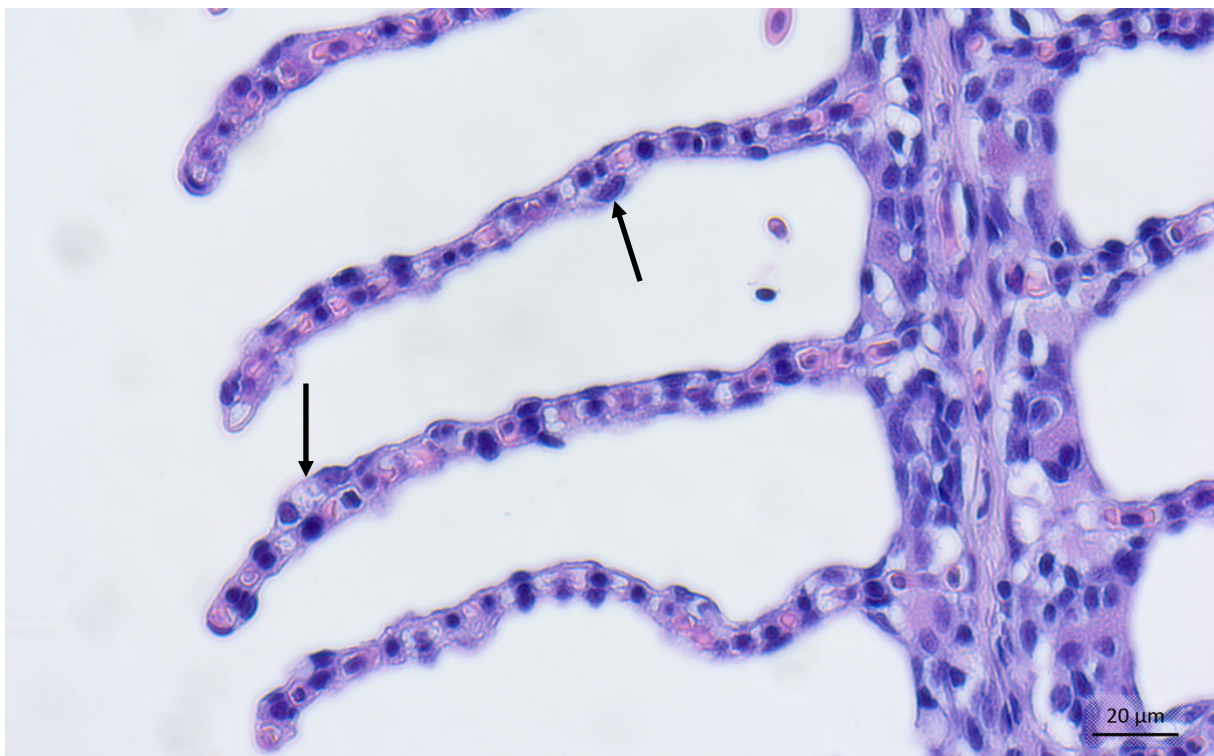
**Figur 3.7.** Gjennomsnittleg gjellescore av alle seks kara for dei elleve patologiske endringane inkludert i dette studiet, ved tre prøveuttak. **I:** slimcellehyperplasi, **II:** klubbing, **III:** lifting, **IV:** hypertrofi av epitelceller, **V:** hyperplasi av epitelceller, **VI:** fortjukka distal primærlamelle, **VII:** fersk aneurisme, **VIII:** blødande aneurisme, **IX:** gammal aneurisme, **X:** inflammasjon og **XI:** nekrose. Gjellescore frå 0-3. Feilfelte syner standardavviket mellom prøvane. N= 60 for kvart uttak (10 fisk frå kvart kar), med unntak av 7 dagar etter behandling der N= 58.

Snitt i figur 3.8 syner korleis hovudandelen av det undersøkte gjellevevet såg ut for alle kara ved alle tre uttaka, ingen tydelege patologiske endringar. Det vart observert enkelte hypertrofe celler i dei fleste snitta, i hovudsak score 1 (figur 3.9). Enkelte områder med klubbing (figur 3.10), hyperplasi av epitelceller og slimcellehyperplasi (figur 3.11) vart og observert. Det vart observert lakselus (chalimus) på sju snitt frå fyrste prøveuttak, og på eit snitt ved andre prøveuttak (Kar-6: smitta og behandla). Distalt på primærlameller i området rundt lakselusa, vart det observert hyperplasi av epitelceller og inflammasjon (figur 3.12).

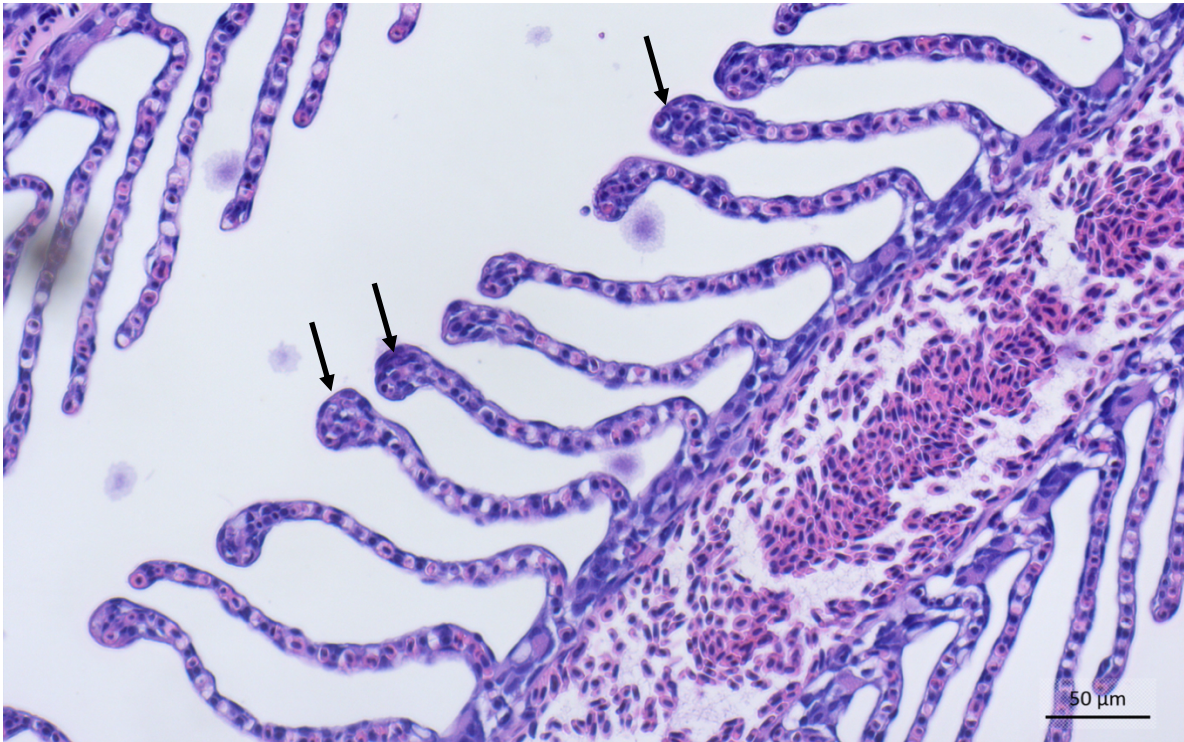




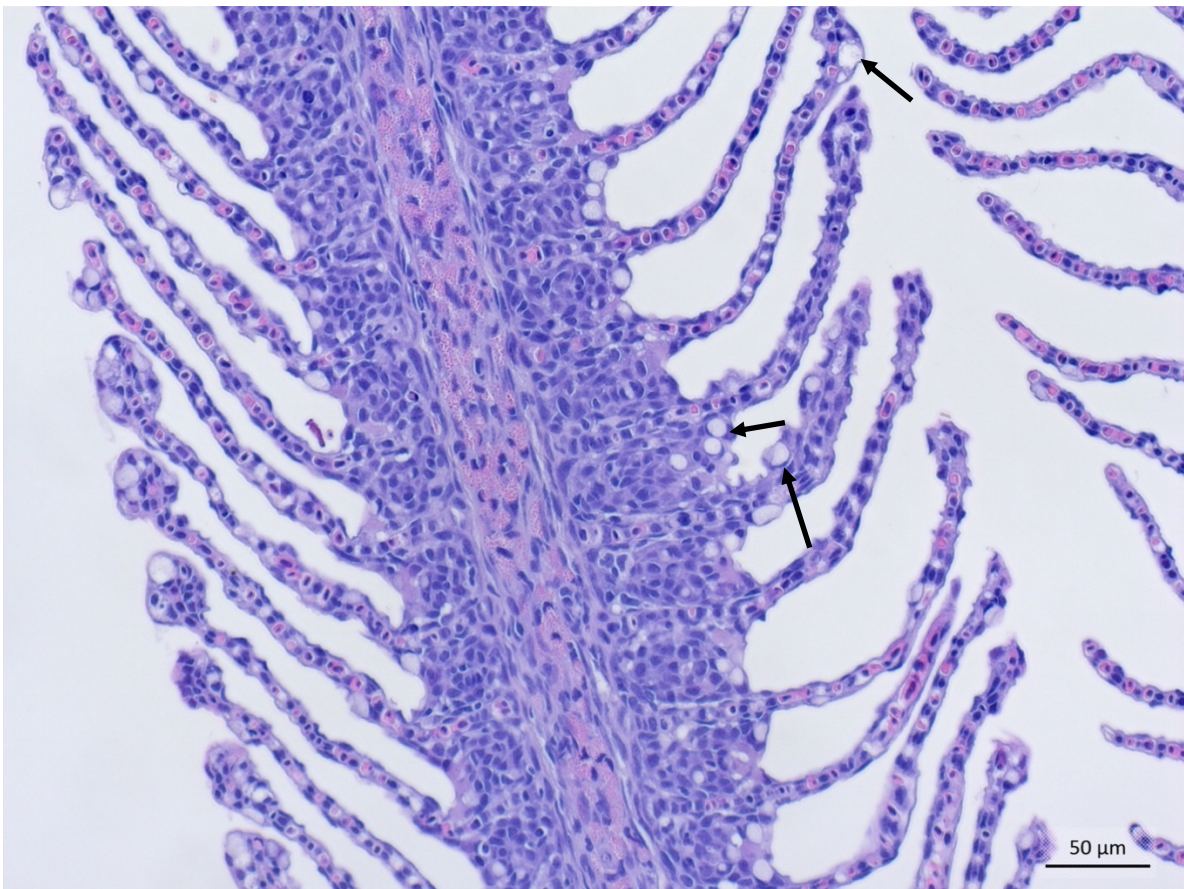
**Figur 3.8.** Histologi som syner standarden for undersøkt gjellevev ved smitteforsøket, med tydelege sekundærlameller utan patologiske endringar. **A:** fisk nr. 27 frå kar-3 (usmitta), ved uttak før behandling. **B:** fisk nr. 61 frå kar-1 (kontrollgruppe) ein dag etter behandling. **C:** fisk nr. 162 frå kar-5 (smitta og behandla), ved uttak sju dagar etter behandling. Stav: 50 μm.



**Figur 3.9.** Histologi frå fisk nr. 1 frå kar-1 (kontrollgruppe), ved uttaket før behandling. Fine gjeller med enkelte hypertrofe epitelceller (pil). Stav: 20 μm.

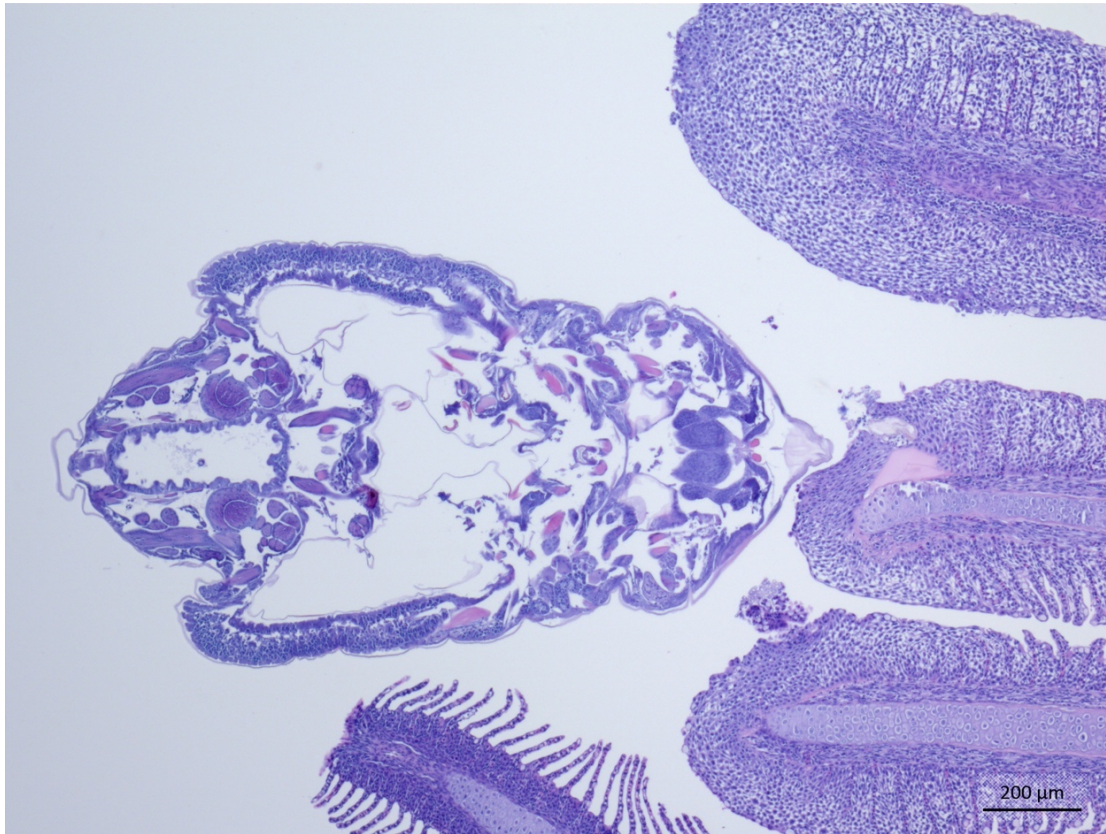


**Figur 3.10.** Histologi frå fisk nr. 34 frå kar-4 (smitta), ved uttaket før behandling. Klubbing distalt på sekundærlameller (pil), i enkelte områder. Stav: 50 μm.



**Figur 3.11.** Histologi frå fisk nr. 64 frå kar-1 (kontrollgruppe), ved uttaket ein dag etter behandling. Hyperplasi av epitelceller ved basis av sekundærlameller og slimcellehyperplasi (piler). Stav: 50 μm.

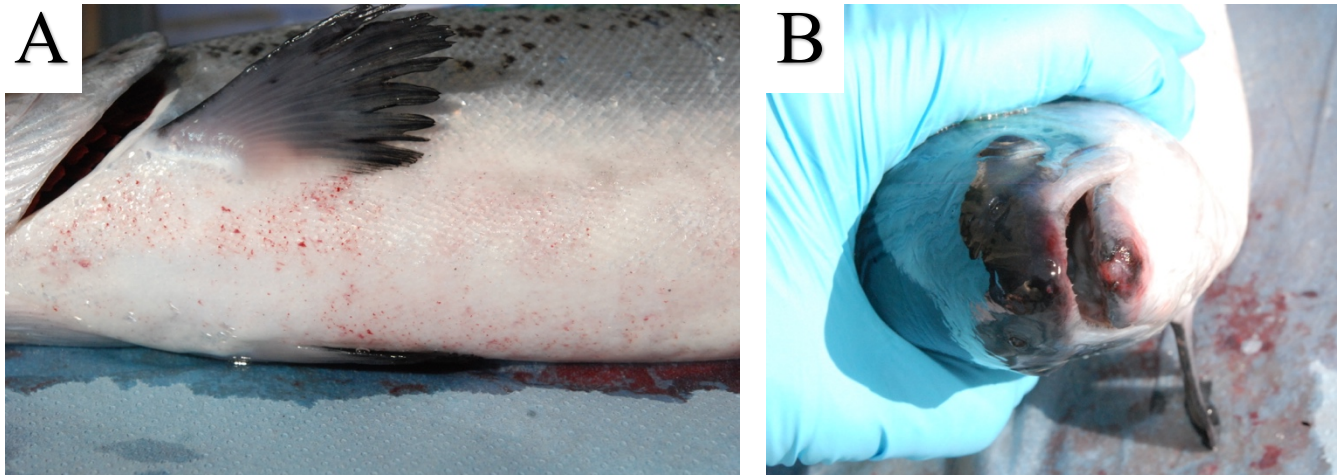




**Figur 3.12.** Histologi frå fisk nr. 54 frå kar-6 (smitta), ved uttaket før behandling. Lakselus (chalimus), med hyperplasi av epitelceller og inflammasjon distalt på primærlameller i området rundt. Stav: 200 μm.

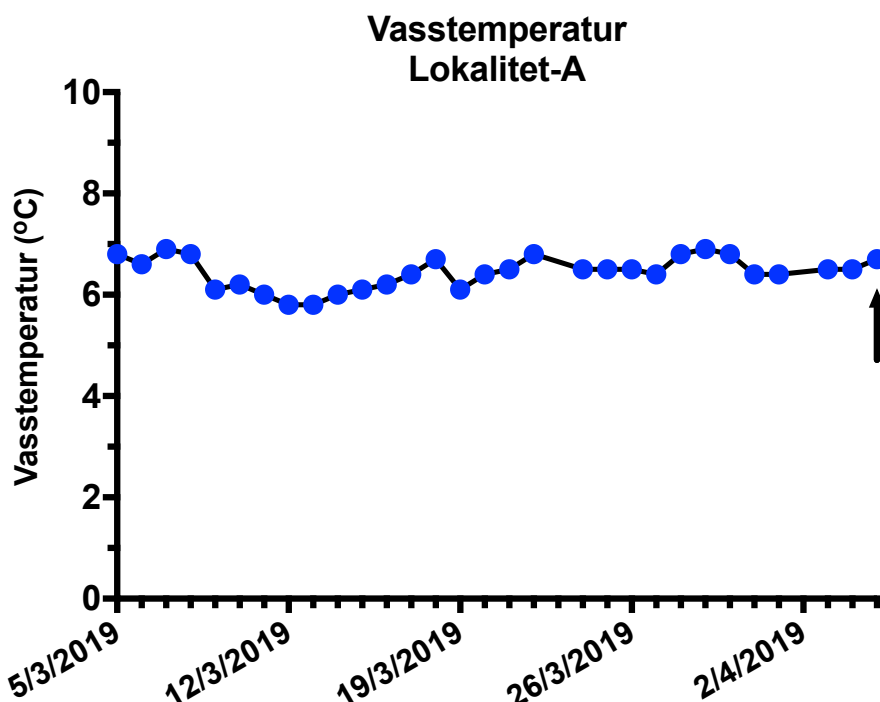
## 3.2 Avlusing med Thermolicer på lokalitet-A

Ved fyrste prøveuttak, 11 dagar før avlusinga, hadde fisken (*Salmo salar*) ei gjennomsnittsvekt på  $1046 \pm 188$  gram og ei gjennomsnittleg lengd på  $45 \pm 3$  cm. Det var i gjennomsnitt 4,1 mobile lus per fisk med variasjonar frå 0-10. På dette tidspunktet hadde fisken lite synleg patologi. Berre enkeltfisk hadde noko blødning på buken (figur 3.13A) og slitasje på snuten (figur 3.13B). Makroskopisk såg ein lite eller ingen endring på gjellene.

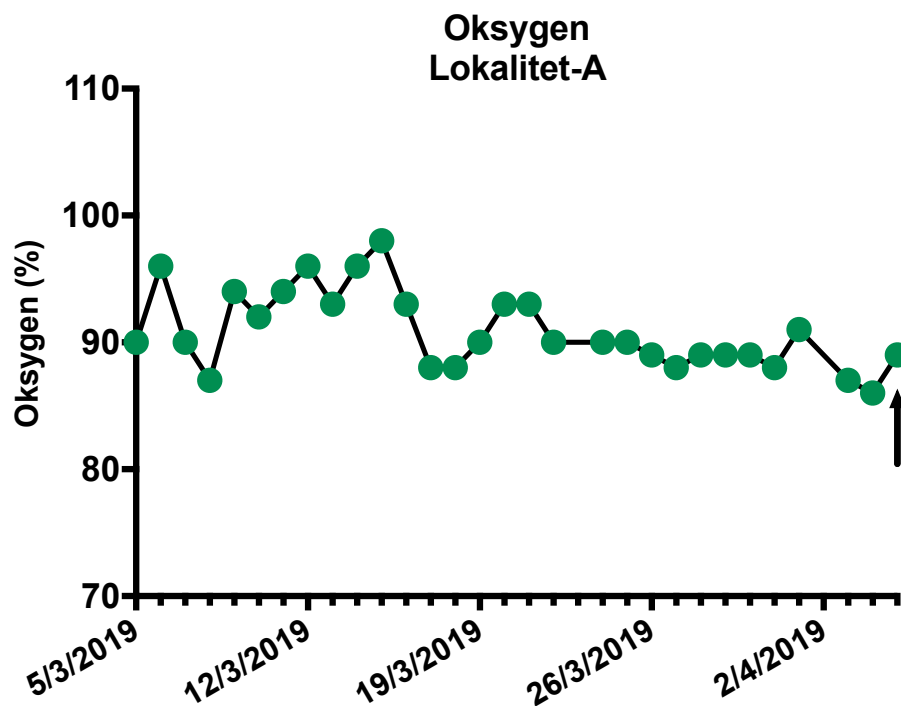


**Figur 3.13.** Synlig patologi ved prøvetaking elleve dagar før behandling med Thermolicer på lokalitet-A. **A:** blødning på buken og **B:** slitasje på snuten.

Temperaturen i sjøen låg mellom 5,8 og 6,9 °C i månaden før behandlinga. På behandlingdagen var temperaturen 6,7 °C (figur 3.14). Oksygenmetninga i sjøen var mellom 85-100 % i månaden før behandling, og på behandlingdagen 89 % (figur 3.15). Saliniteten i sjøen var tilnærma full sjø, over 32 ‰.

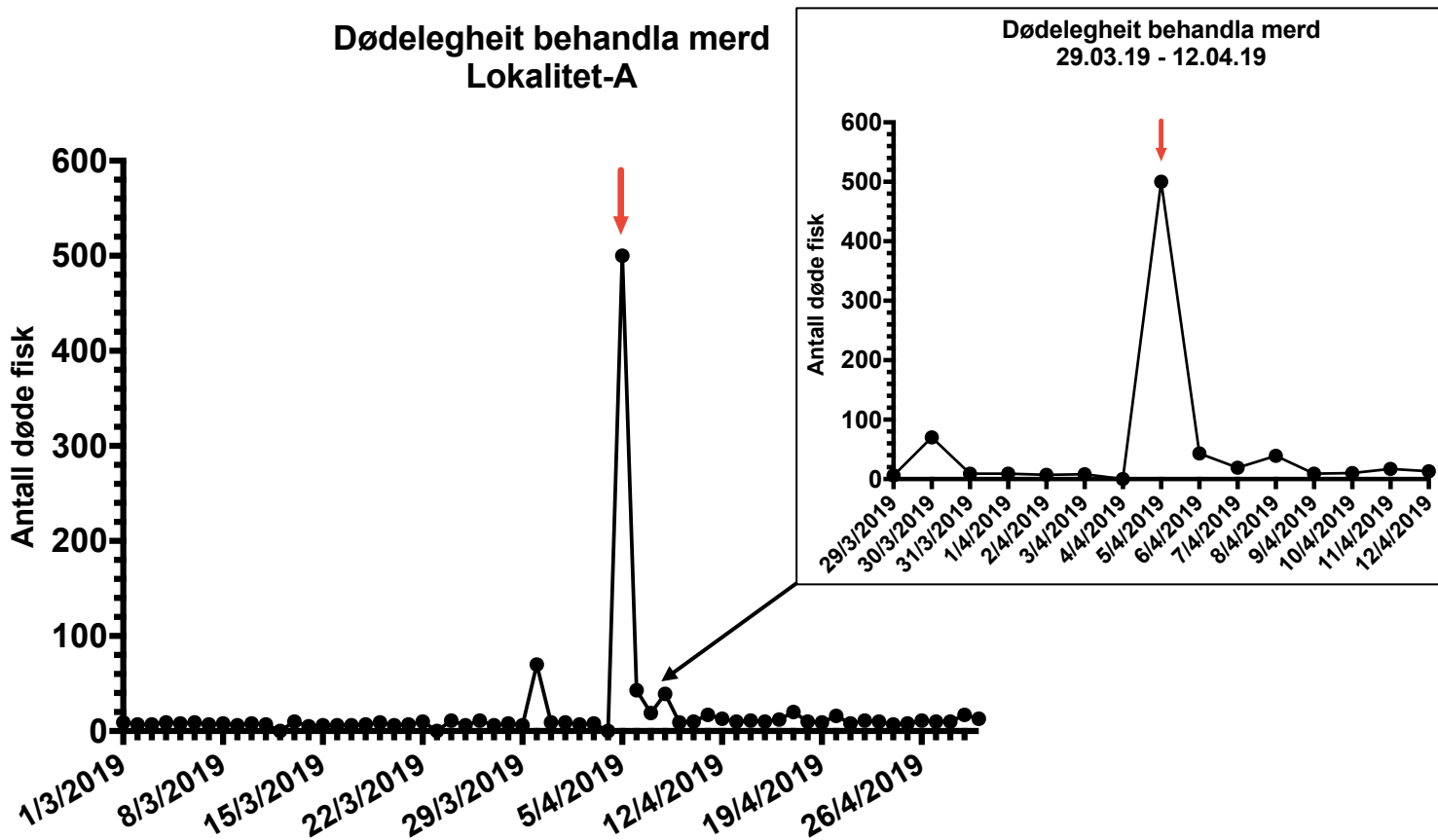


Figur 3.14. Temperaturen i sjøen med daglege registreringar frå ein måned før behandling og fram til behandlingdagen på lokalitet-A. Pil syner behandlingdagen.



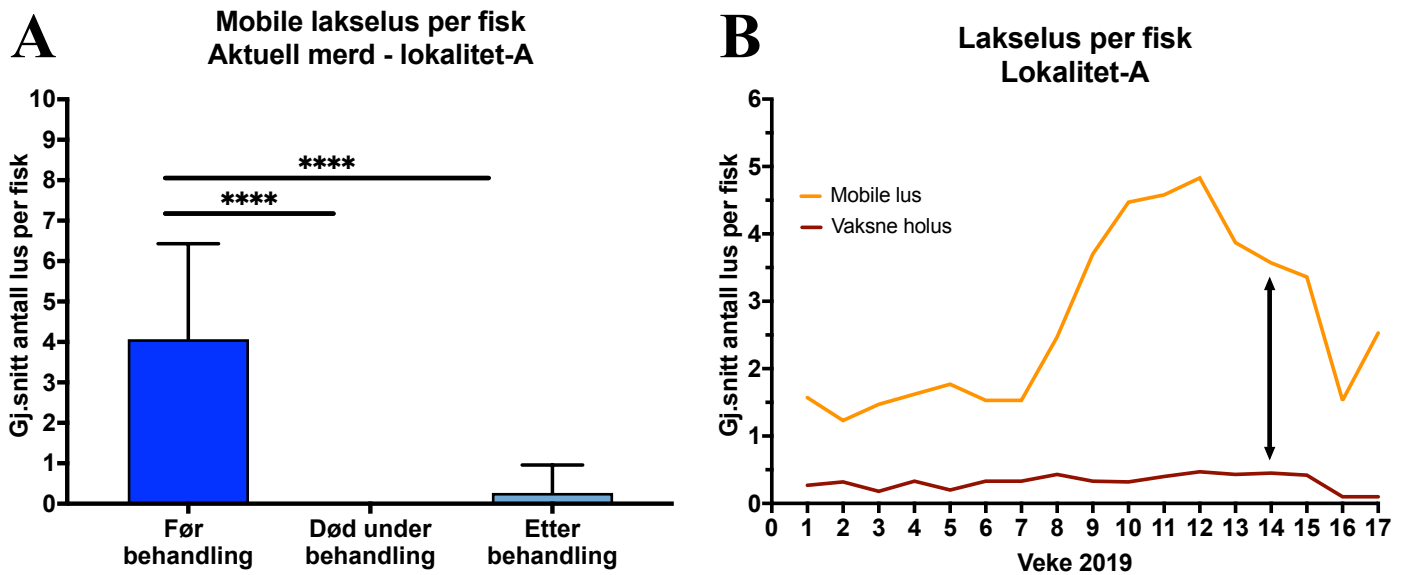
Figur 3.15. Oksygen i sjøen med daglege registreringar frå ein måned før behandling og fram til behandlingdagen på lokalitet-A. Pil syner behandlingdagen.

Det døydde 500 fisk i den aktuelle merda på behandlingsdagen. Dette utgjør 0,4 % av behaldninga i den aktuelle merda. Det vart ikkje observert noko gross patologi av betydning på dei 30 undersøkte dødfiskane, og det vart heller ikkje registrert mobile lus på denne fisken. Makroskopisk såg ein ingen lesjonar på gjellene. I dei tre påfølgjande dagane etter behandlinga døydde det henholdsvis 43, 19 og 39 fisk. Etter dette var dødelegheita tilnærma lik før behandling, med eit gjennomsnitt på 11 døde individ per dag (figur 3.16).



**Figur 3.16.** Dagleg dødelegheit i den aktuelle merda ein periode før og etter behandling. Rød pil syner dødelegheita på behandlingsdagen. Utsnittet syner dødelegheita i merda i ein periode på ei veke før og ei veke etter behandlingsdagen.

Utifrå dei 30 fiskane som vart tekne ut før, under og etter behandling i dette forsøket, vart gjennomsnittleg antall mobile lakselus per fisk redusert frå 4,1 før behandling til 0,0 og 0,3 ved dei to uttaka etter behandling (figur 3.17A). Det var ein signifikant reduksjon ved begge uttak etter behandling ( $P \leq 0,0001$ ). I følge BarentsWatch og innrapporterte lusetal frå lokaliteten, kan ein og sjå ein svak reduksjon i gjennomsnittleg antall mobile lakselus (figur 3.17B). Antallet vaksne holus er relativt stabilt etter behandling og vert redusert ei veke etter. Dette skuldast at halve lokaliteten vart behandla i veke 14, og resten veka etter, medan lusetalet gjeld for heile lokaliteten.



**Figur 3.17.** Gjennomsnittleg antall lakselus per fisk i samband med behandling med Thermolicer på lokalitet-A. **A:** Gjennomsnittleg antall mobile lakselus per fisk, talt før, under og etter behandling i aktuell merd. N= 30 for kvart uttak. Feilfeltene syner standardavviket (SD) mellom prøvane. \*\*\*\* P ≤ 0,0001. **B:** Gjennomsnittleg lusetal på heile lokaliteten, kvar veke i ein periode før og etter behandling med Thermolicer (tal henta frå BarentsWatch). Oransje linje syner antall mobile lus og raud linje antall vaksne holus. Svart pil syner veka avlusinga i dette studiet vart gjennomført.

Ved prøveuttaket tre dagar etter behandling vart det observert blødningar på buken hos 6 av dei 30 undersøkte fiskane. Ein fisk hadde eit sår på sida. Utanom det vart det ikkje observert annan synleg patologi. Gjellene hadde ingen makroskopiske endringar.

### 3.2.1 Kartlegging av mikroparasittar

Alle dei 90 analyserte prøvane (tekne ut før, under og etter behandling) var negative for virusa Salmonid alfavirus (SAV), Salmonid gjellepoxvirus (SGPV), Atlantisk laksecalicivirus (ASCV), *Infeksiøs pankreasnekrosevirus (IPNV)* og Salmonid herpesvirus 4 (SalH-4). Det var heller ingen positive prøvar for bakterien *Tenacibaculum maritimum* eller amøben *Paramoeba perurans*, med unntak av ein dødfisk (Ct-verdi 26,0).

Følgjande patogen var positive ved analyse av gjelle- og nyrevev: ILAV, *Piscin orthoreovirus 1 (PRV-1)*, *Piscin myokardittvirus (PMCV)*, *Cand. B. cysticola*, *Tenacibaculum spp.*, *Yersinia ruckeri*, *Paranucleospora theridion*, *I. salmonis* og *Parvicapsula pseudobranchicola*.

Alle dei 90 analyserte prøvane var positive for *PRV*, med signifikant lågast densitet etter behandling (figur 3.18). Ved analyse av gjellevev var densiteten signifikant høgast før

behandling (Død under  $P \leq 0,01$  og etter  $P \leq 0,0001$ ), medan det i nyrevevet ikkje var signifikant ulikheit mellom før behandling og dødfisken (figur 3.19).

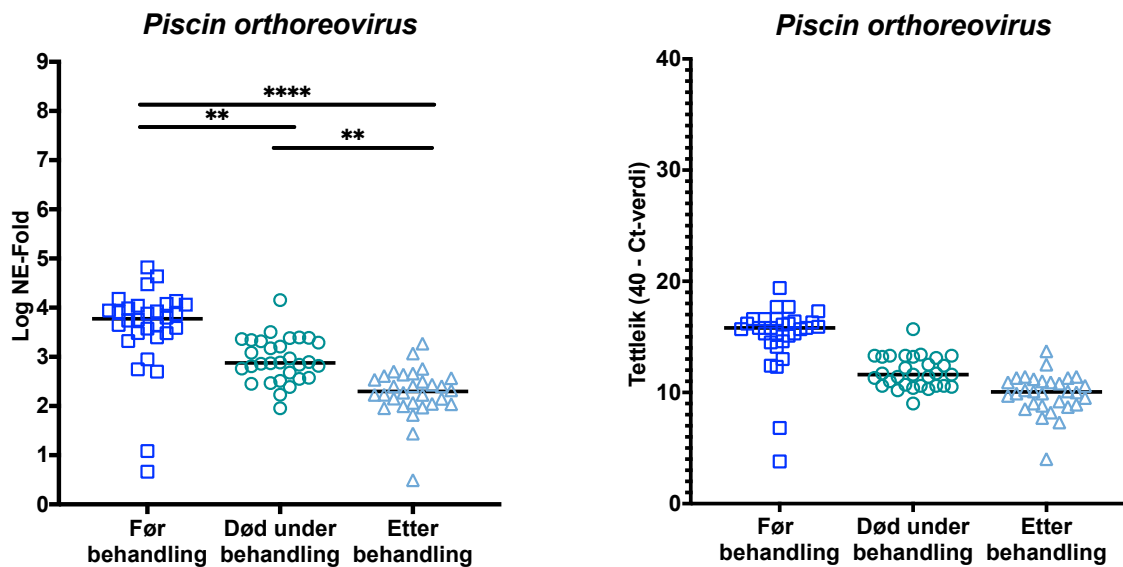
Alle dei analyserte gjelleprøvane var og positive for bakterien *Cand. B. cysticola*, med signifikant lågast densitet før behandling (Død under  $P \leq 0,001$  og etter  $P \leq 0,0001$ ) (figur 3.20). Nyreprøvane var positive for all fisken som døydde under behandling, og for tre individ etter behandling (figur 3.21).

Gjelleprøvane hadde ein prevalens på 100 % for *P. theridion*, med unntak av ein prøve før behandling og ein prøve etter behandling (figur 3.22). Det var ingen signifikant forskjell mellom dei tre uttaka. Prevalensen var lågare før behandling ved analyse av nyreprøvane (figur 3.23).

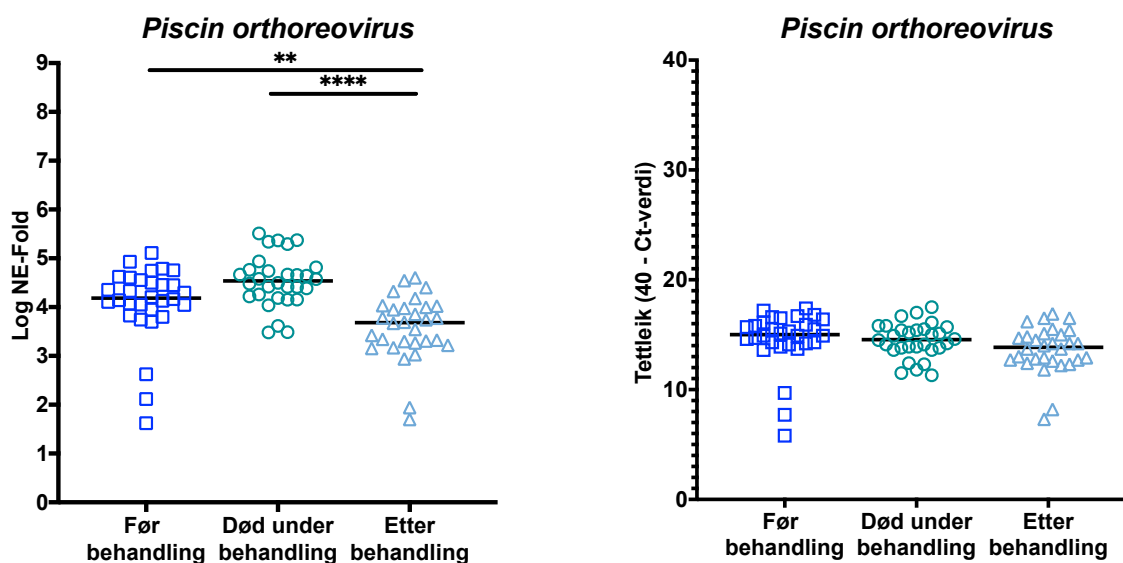
Dei 30 gjelleprøvane som vart tekne ut frå dødfisken var alle positive for ektoparasitten *I. salmonis*. Det var ingen positive for denne parasitten ved uttaket før behandling, og fire positive individ frå uttaket etter behandling (figur 3.24).

Dei andre patogene fisken var positiv for hadde låg prevalens og/eller låg densitet, og er lista i tabell 3.3.

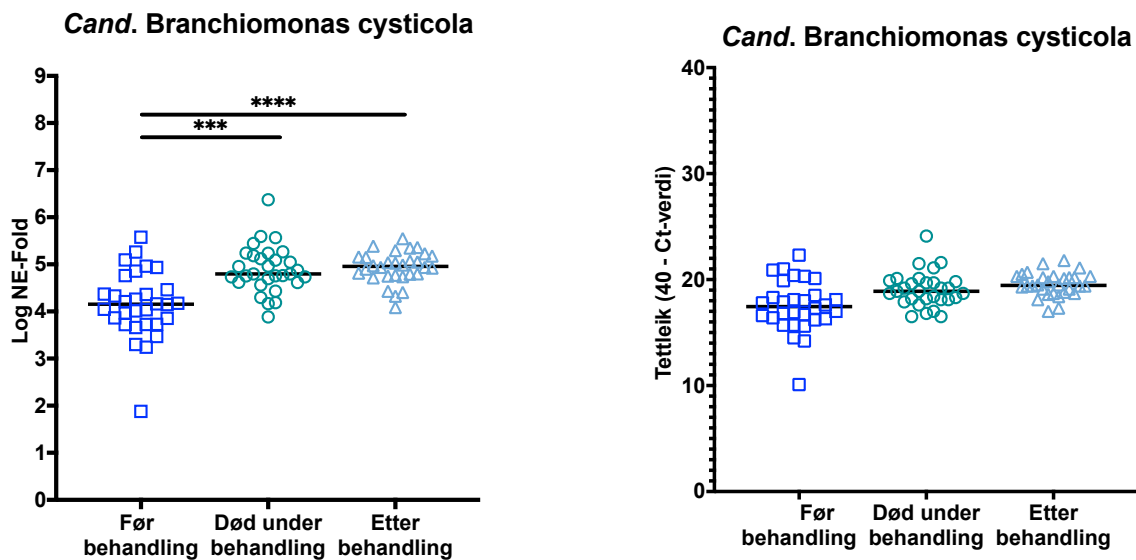
Diversitetsindeksen var 2,6 både ved uttaket før og etter behandling. For dødfisken var den 3,0.



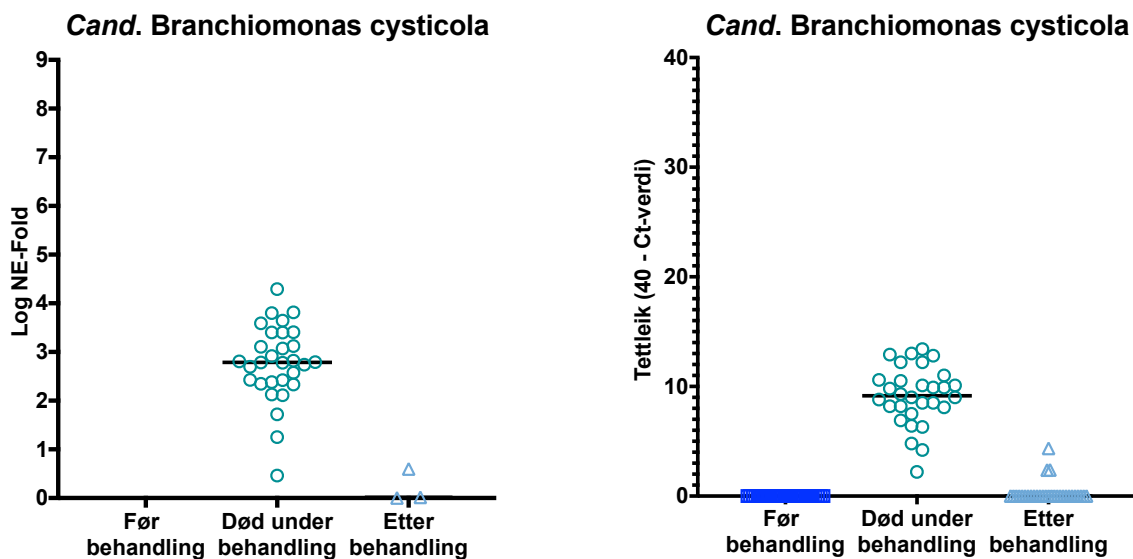
**Figur 3.18.** Densitet av *PRV* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellevev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*  $P \leq 0,01$  og \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$



**Figur 3.19.** Densitet av *PRV* for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*  $P \leq 0,01$  og \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

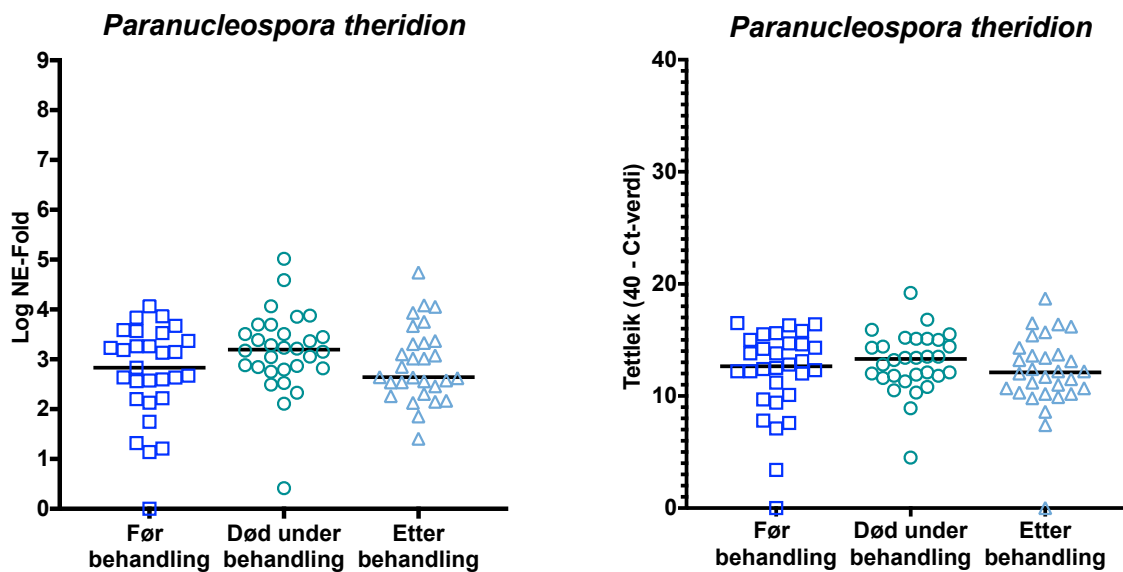


**Figur 3.20.** Densitet av *Cand. B. cysticola* for kvart enkelt individ ved analyse av gjelelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*\*  $P \leq 0,001$  og \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

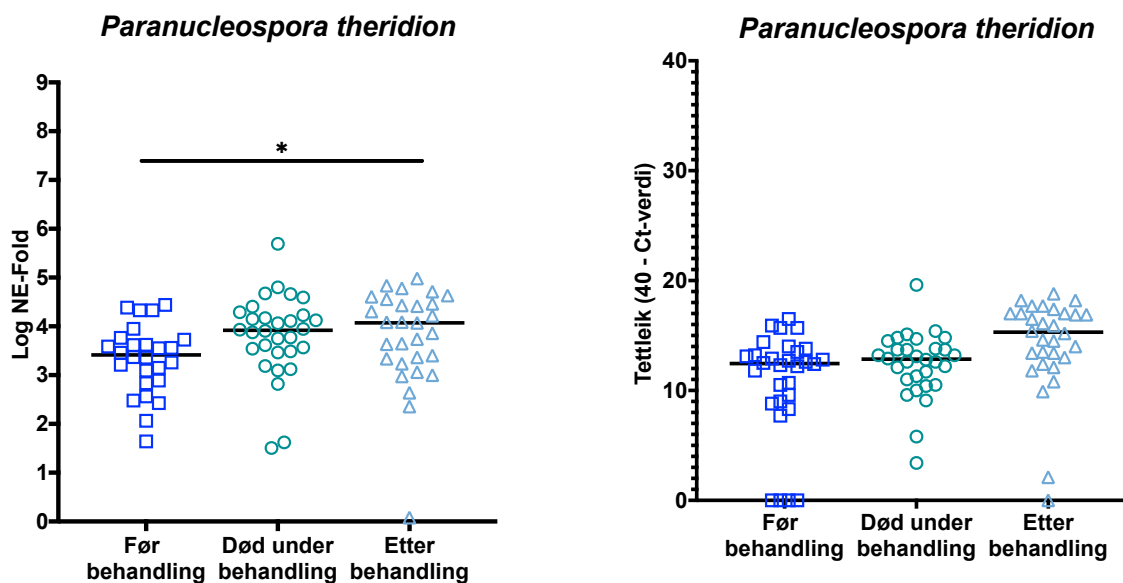


**Figur 3.21.** Densitet av *Cand. B. cysticola* for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 0, 100 og 10 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak.

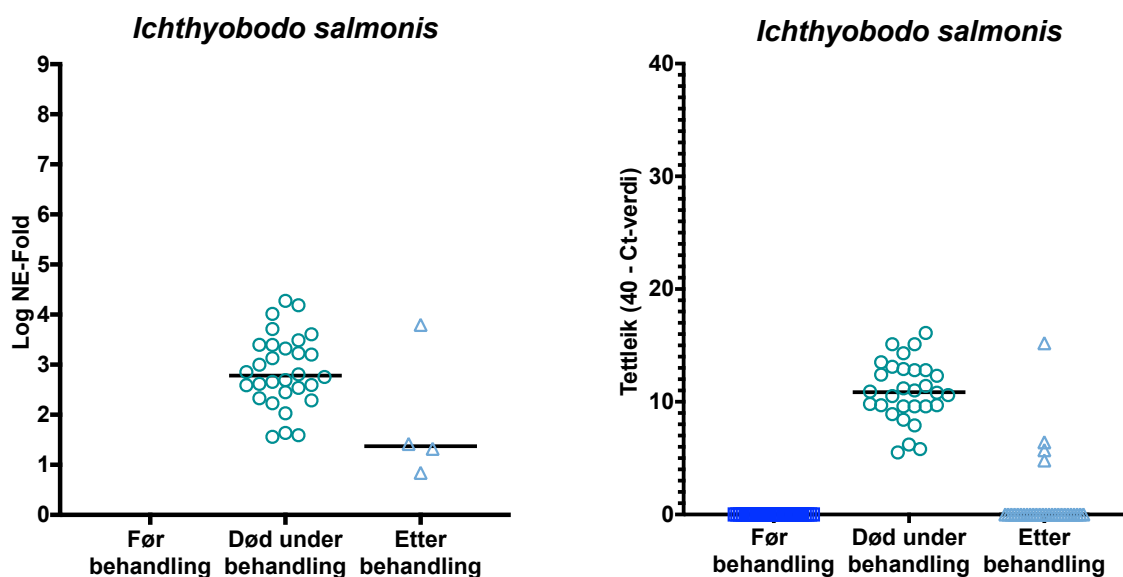




**Figur 3.22.** Densitet av *P. theridion* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellevæv ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 97, 100 og 97 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak.



**Figur 3.23.** Densitet av *P. theridion* for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 87, 100 og 97 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*  $P \leq 0,05$ .



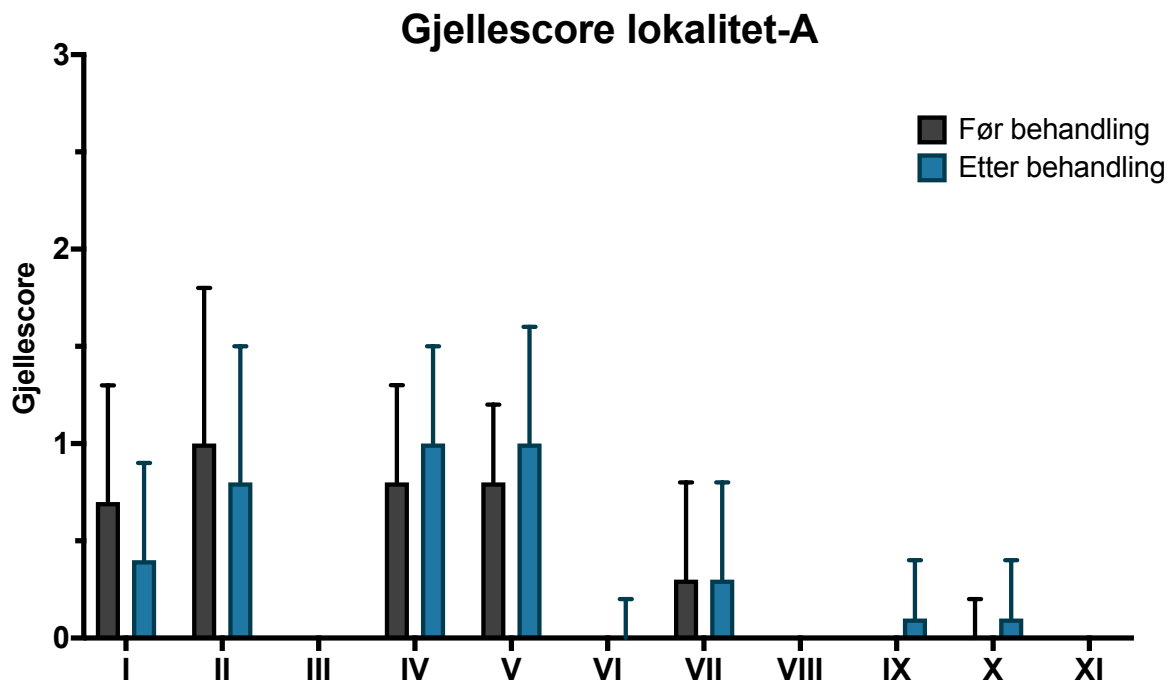
**Figur 3.24.** Densitet av *I. salmonis* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 0, 100 og 13 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak.

**Tabell 3.3.** Påvising av ILAV, PMCV, *P. pseudobranchicola*, *Tenacibaculum* spp. og *Y. ruckeri* med låg densitet og/eller låg prevalens. Tre prøveuttak. Syner gjennomsnittleg Ct-verdi ved alle tre uttaka for kvart patogen, i tillegg til rangen for dei positive Ct-verdiar og prevalensen. Nokre analyserte gjelleprøvar (Gj) og nokre analyserte nyreprøvar (Ny). N= 30 for alle patogena ved alle tre uttaka.

	Før behandling			Død under behandling			Etter behandling		
	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens
ILAV (Gj)	31,9	27,0 - 36,2	40	31,9	31,9	3	34,4	31,3 - 37,1	40
PMCV (Ny)	Neg	Neg	Neg	36,7	35,9 - 37,2	10	37,0	37,0	3
<i>P. pseudobranchicola</i> (Gj)	34,0	30,5 - 36,5	10	31,6	31,2 - 32,1	7	37,0	37,0	3
<i>Tenacibaculum</i> spp. (Gj)	34,7	30,1 - 38,9	17	33,0	27,9 - 35,3	73	34,2	31,4 - 36,9	43
<i>Tenacibaculum</i> spp. (Ny)	Neg	Neg	Neg	34,8	33,4 - 36,3	27	Neg	Neg	Neg
<i>Y. ruckeri</i> (Ny)	38,8	37,0 - 39,9	30	38,0	36,5 - 39,4	10	38,4	35,2 - 39,7	17

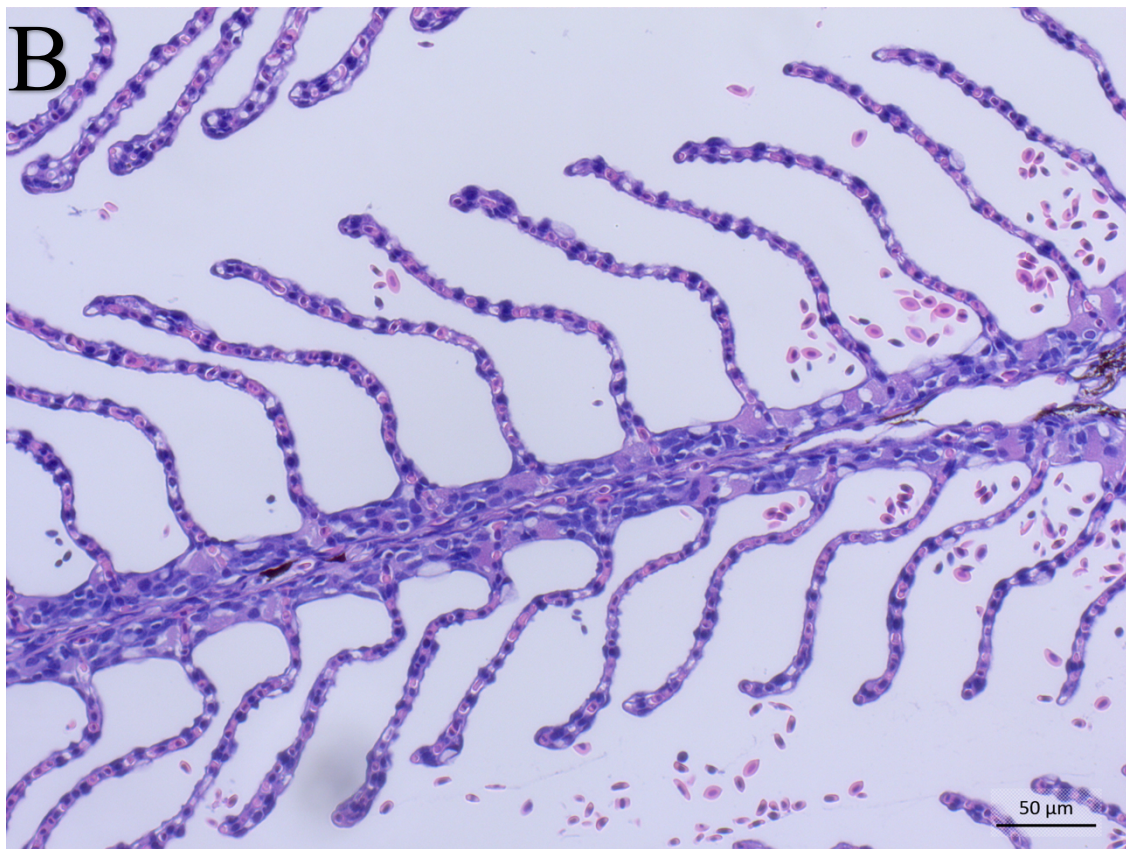
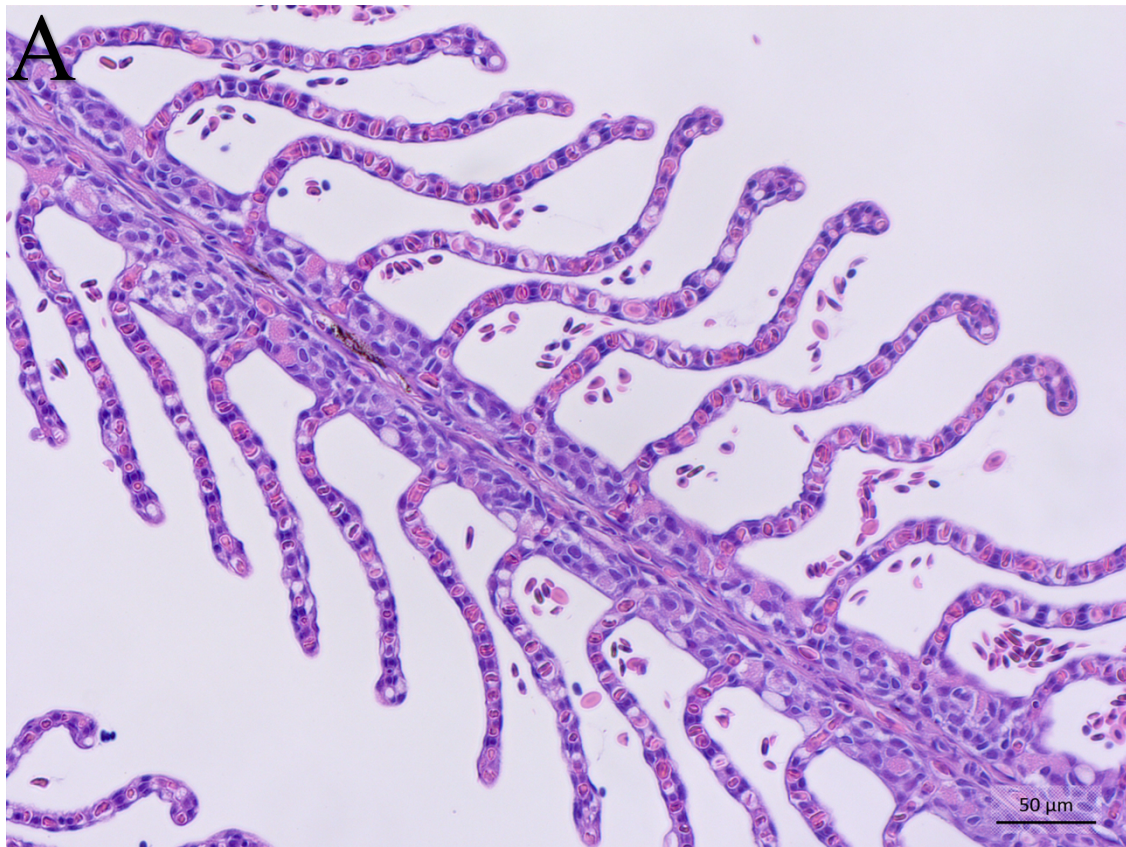
### 3.2.2 Histopatologi

Gjellescoren synte relativt lik gjennomsnittleg score ved begge uttaka for alle registrerte endringar (figur 3.25). I hovudsak vart score 0 og 1 nytta, som vert rekna som milde endringar. For enkelt fisk vart score 2 gjeven. Det var ingen tydeleg utvikling av gjellescore etter behandling med Thermolicer.

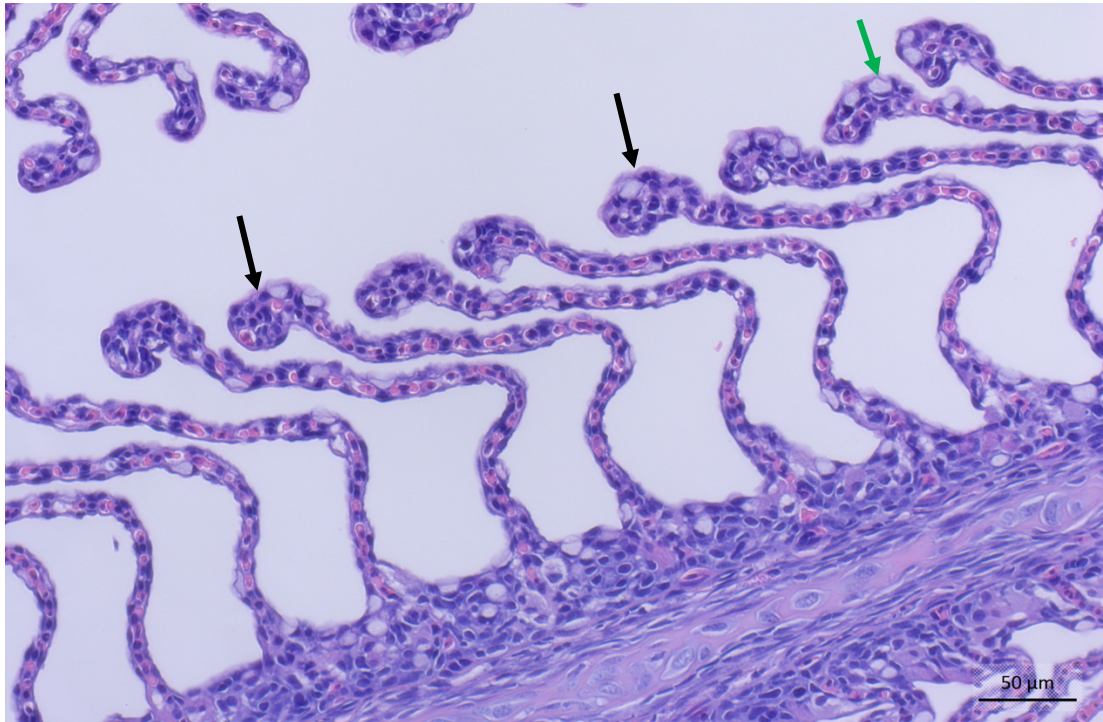


**Figur 3.25.** Gjennomsnittleg gjellescore for dei elleve patologiske endringane inkludert i dette studiet, ved uttak før og etter behandling med Thermolicer på lokalitet-A. **I:** slimcellehyperplasi, **II:** klubbing, **III:** lifting, **IV:** hypertrofi av epitelceller, **V:** hyperplasi av epitelceller, **VI:** fortjukka distal primærlamelle, **VII:** fersk aneurisme, **VIII:** blødande aneurisme, **IX:** gammel aneurisme, **X:** inflammasjon og **XI:** nekrose. Gjellescore frå 0-3. Feilfelte syner standardavviket mellom prøvane. N= 30 for begge uttaka.

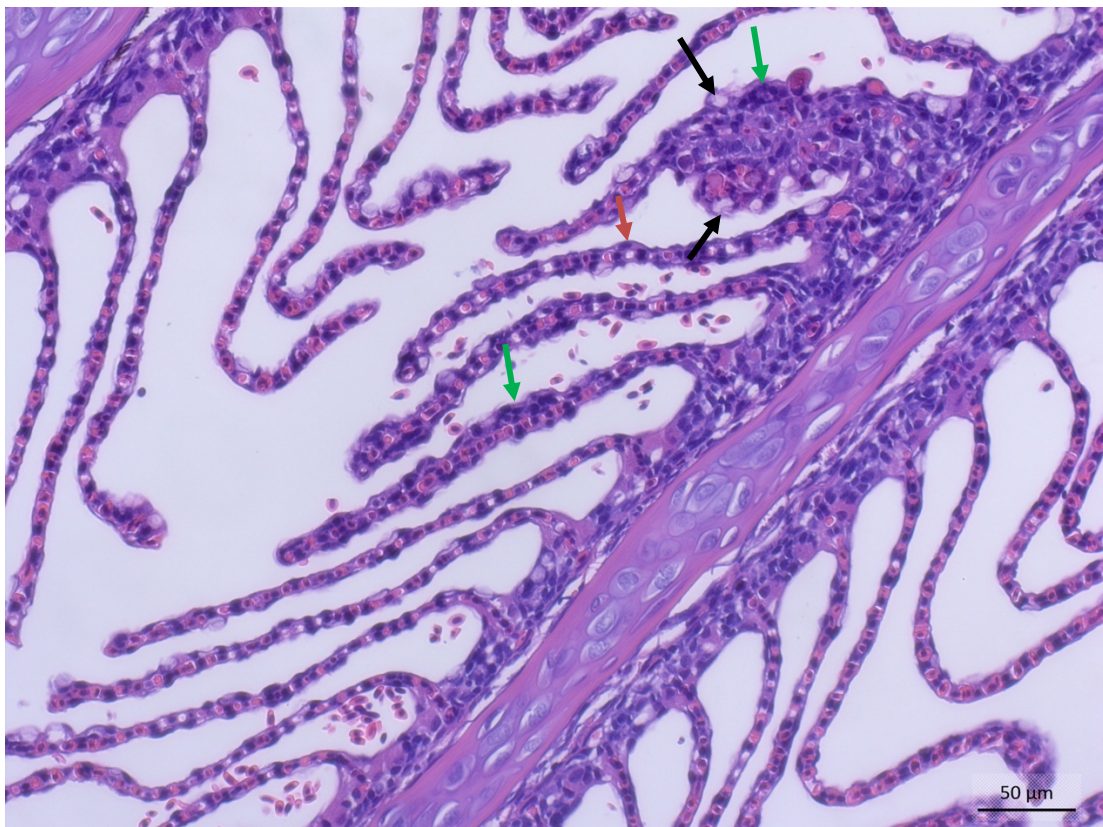
Mesteparten av det undersøket gjellevevet, både før og etter behandling, var utan patologiske endringar (figur 3.26). I enkelt celler og enkelt områder vart det derimot observert milde endringar i form av auke i antall slimceller på sekundærlamellene, klubbing (figur 3.27) og hypertrofi og hyperplasi av epitelceller (figur 3.28). I tillegg vart det observert enkelt fisk med ferske aneurismar både før og etter behandling (figur 3.29). Etter behandling vart det og observert enkelt fisk med eldre aneurismar og inflammasjon. Epiteliocystar utan patologi i området rundt, vart observert i tre fisk etter behandling (figur 3.30).



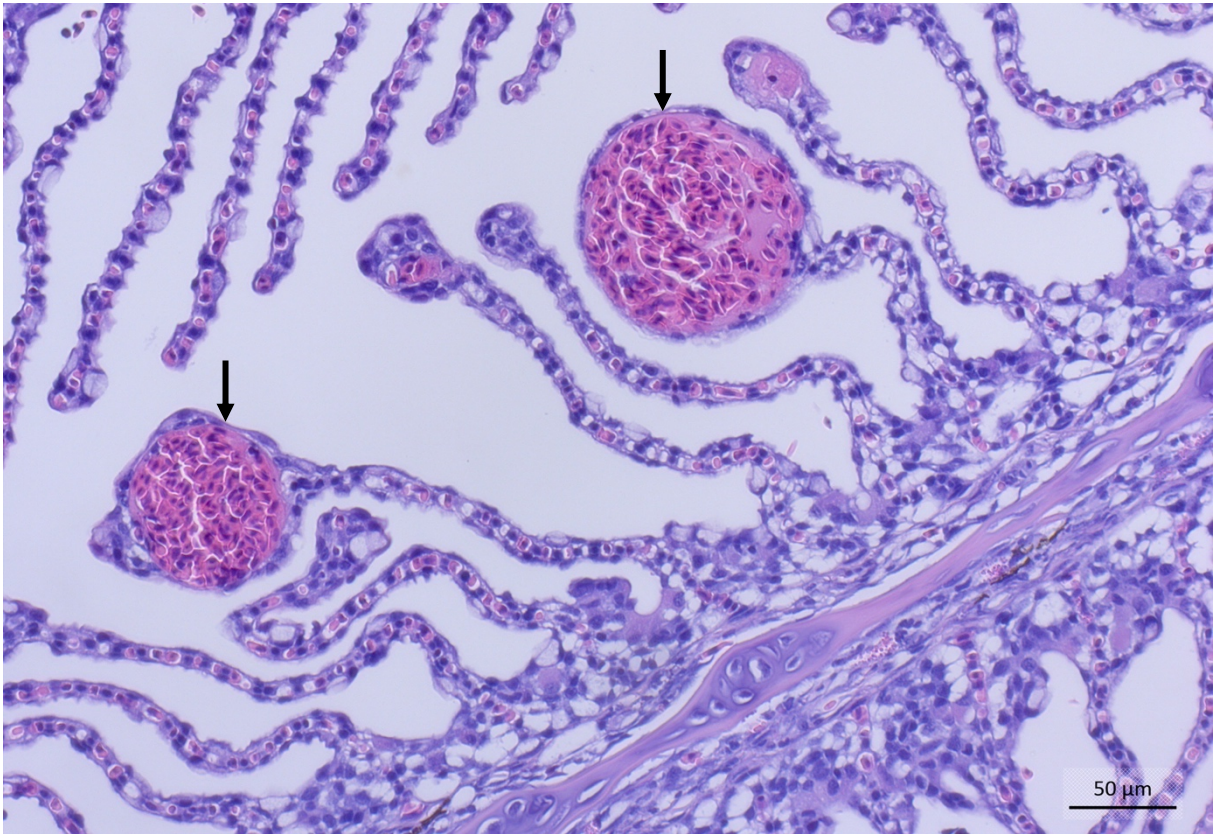
**Figur 3.26.** Histologi som syner standarden for undersøkt gjellevev frå lokalitet-A. **A:** fisk nr. 8 før behandling med Thermolicer og **B:** fisk nr. 86 etter behandling med Thermolicer. Blodcellene mellom sekundærlamellene er eit resultat av prøvetaking. Stav: 50 μm.



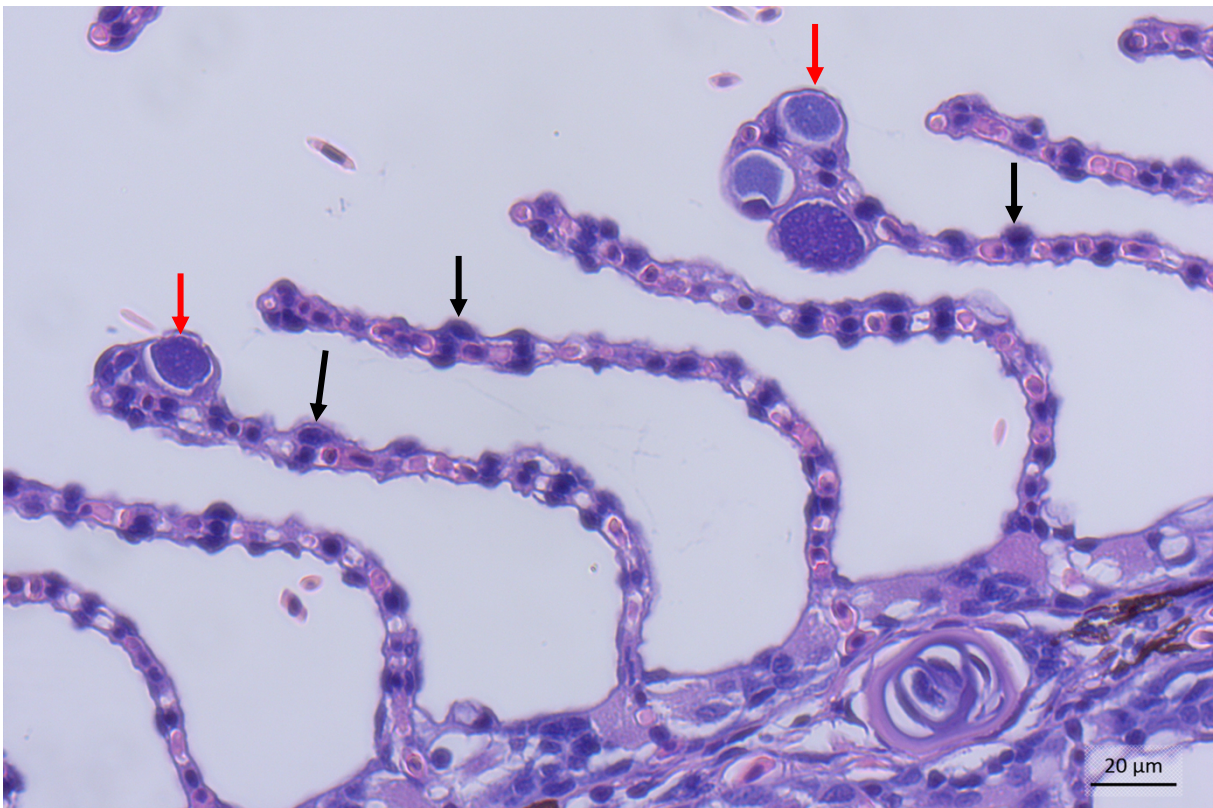
**Figur 3.27.** Histologi som syner klubbing (svart pil) og auke i slimceller (grøn pil) apikalt på sekundærlameller i enkelt områder hos fisk nr. 82 etter behandling. Stav: 50 μm.



**Figur 3.28.** Histologi av gjellelev fra fisk nr. 78 etter behandling som syner hypertrofi av enkelte epitelceller (raud pil), hyperplasi av epitelceller i enkelte sekundærlameller (grøn pil) og slimcellehyperplasi (svart pil). Stav: 50 μm.



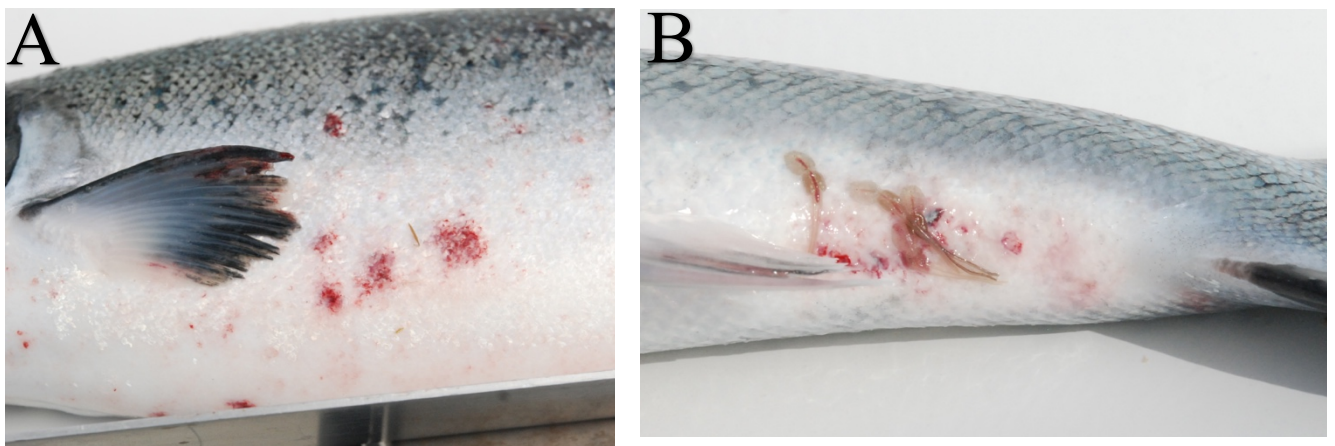
**Figur 3.29.** Histologi av gjellevev frå fisk nr. 85 etter behandling som syner ferske aneurisamar (svart pil) i enkelte sekundærlameller. Stav: 50 μm.



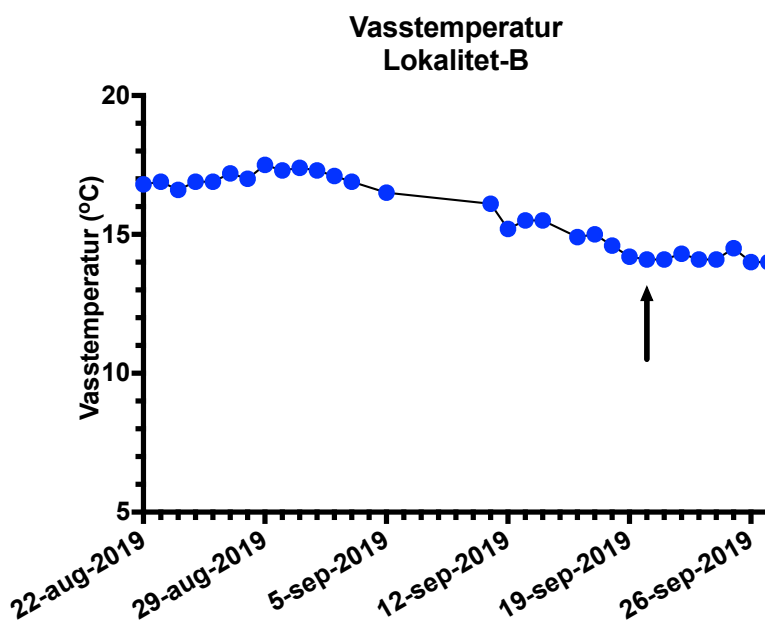
**Figur 3.30.** Histologi av gjellevev frå fisk nr. 86 etter behandling som syner epitheliocystar (raud pil) i to sekundærlamellar apikalt på primærlamella. Enkelte hypertrofe epitelceller rundt (svart pil). Stav: 20 μm.

### 3.3 Avlusing med Thermolicer på lokalitet-B

Fisken (*Salmo salar*) hadde ei gjennomsnittsvekt på  $2894 \pm 502$  gram og ei gjennomsnittleg lengd på  $61 \pm 4$  cm ved fyrste prøveuttak, to dagar før behandling. Det var i gjennomsnitt 4,6 mobile lus per fisk med ein variasjon frå 1-11. Eit par fiskar hadde bleike gjeller og all undersøkt fisk hadde blødning i huden (figur 3.31A) og bak gattfinna assosiert med lakselus (figur 3.31B). I havoverflata var temperaturen  $14,5$  °C og på 5 meter djupn var den  $15,0$  °C. I månaden før behandlinga 20.09.2019 låg sjøtemperaturen mellom  $14,2$  og  $17,5$  °C, med ein topp i slutten av august før den gradvis vart lågare i september (figur 3.32). På behandlingdagen var sjøtemperaturen  $14,1$  °C. Saliniteten i sjøen var tilnærma fullt sjøvattn.

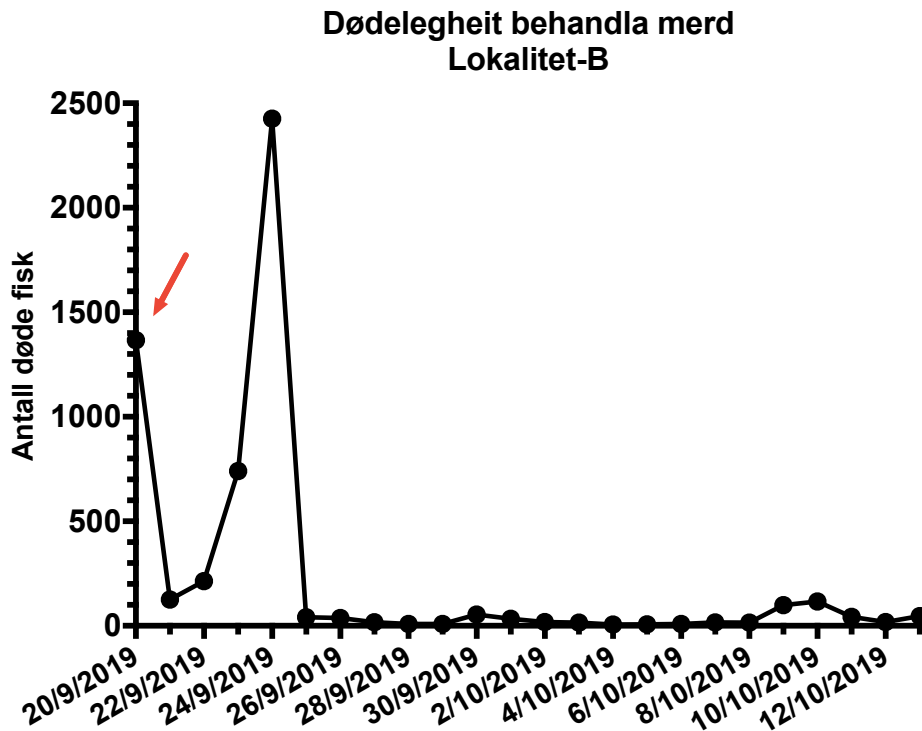


**Figur 3.31.** Atlantisk laks frå lokalitet-B med blødning i huden to dagar før behandling med Thermolicer. **A:** blødning på buken og bak brystfinna. **B:** blødning i huden bak gattfinna i nærleik av lakselus.



**Figur 3.32.** Sjøtemperaturen på lokalitet-B i ein periode før behandling og fram til ei veke etter behandling. Kvart punkt representerer ei registrering, omtrent daglege registreringar. Pil syner behandlingdagen.

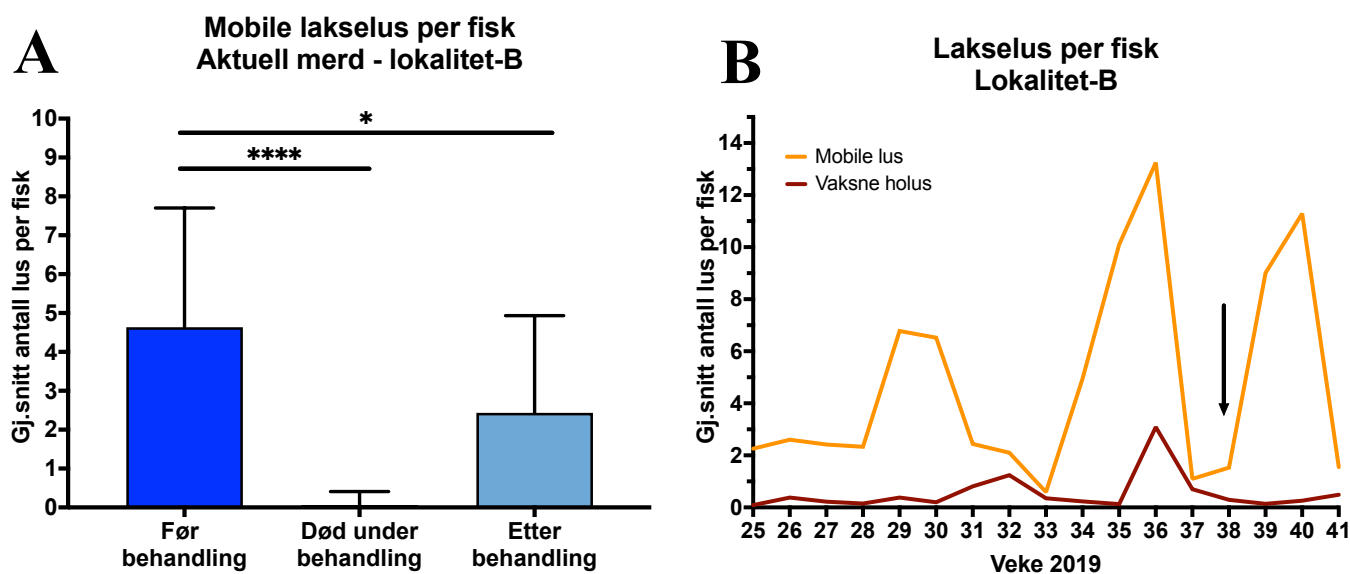
Det døydde 1366 fisk i den aktuelle merda på behandlingdagen (figur 3.33), som utgjør 0,9 % av behaldninga i denne merda. Den undersøkte fisken som døydde under behandling hadde blødning på buken, i tillegg hadde 26 av 30 koagulert blod i pericardialhola. I dei to påfølgjande dagane sank dagleg dødelegheit til 125 og 214, før den auka igjen tre og fire dagar etter behandlinga. I perioden fem til 23 dagar etter behandlinga var dødelegheita relativt stabil, med eit gjennomsnitt på 32 døde per dag.



**Figur 3.33.** Dagleg dødelegheit i den aktuelle merda på lokalitet-B, frå behandlingdagen og tre veker fram i tid. Rød pil syner dødelegheita på behandlingdagen.

Ved dei to påfølgjande prøvetakingsdagane vart gjennomsnittleg antall mobile lakselus per fisk redusert frå 4,6 før behandling til 0,1 og 2,4 etter behandling (figur 3.34A). Signifikant reduksjon både hos dødfisken ( $P \leq 0,0001$ ) og eit veke etter behandling med Thermolicer ( $P \leq 0,05$ ). Innrapporterte lusetal frå lokaliteten til BarentsWatch syner ein reduksjon i gjennomsnittleg antall vaksne holus (figur 3.34B). Det var berre delar av lokaliteten som behandla i veke 38, medan dei innrapporterte tala gjeld for heile lokaliteten. Resten av lokaliteten vart behandla i dei påfølgjande vekene (40 og 41). Gjennomsnittleg antall mobile lus aukar etter behandling med Thermolicer i veke 38, men vert kraftig redusert etter siste behandling av lokaliteten i veke 41.





**Figur 3.34.** Gjennomsnittleg antall lakselus per fisk i samband med behandling med Thermolicer på lokalitet-B. **A:** Gjennomsnittleg antall mobile lakselus, talt på fisk før, under og etter behandling i aktuell merd.  $N=30$  for kvart uttak. Feilfelta syner standardavviket (SD) mellom prøvane. \*  $P \leq 0,05$  og \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ . **B:** Gjennomsnittleg antall lakselus på heile lokalitet-B, kvar veke i ein periode før og etter behandling (tal henta frå BarentsWatch). Oransje linje syner antall mobile lus og raud linje antall vaksne holus. Svart pil syner veka avlusinga i dette studiet vart gjennomført.

Ved prøveuttaket sju dagar etter behandling vart det observert blødning på buken hos dei fleste av dei 30 fiskane. I tillegg såg ein enkelt fisk med sår, bleike gjeller og blødning i auge.

### 3.3.1 Kartlegging av mikroparasittar

Dei 90 analyserte prøvane var negative for SAV, SalH-4, ASCV, IPNV, *Paramoeba pemaquidensis* og bakterien *Cand. C. salmonicola*. Gjelleprøvane frå uttaket før og etter behandling vart analysert mot bakterien *Yersinia ruckeri*, ingen av dei 60 analyserte prøvane var positive.

Prøvane var positive for følgjande mikroparasittar: ILAV, SGPV, PRV-1, PMCV, *P. theridion*, *P. perurans*, *I. salmonis*, *P. pseudobranchicola*, *Cand. B. cysticola*, *Tenacibaculum* spp., *T. maritimum*, *Cand. S. salmonis* og *Cand. P. salmonis*.

Alle dei 90 analyserte gjelle- og nyreprøvane var positive for PRV, med signifikant lågast densitet hos dødfisken ved analyse av gjeller (Før  $P \leq 0,001$  og Etter  $P \leq 0,05$ ) (figur 3.35). I nyrene var densiteten signifikant høgast hos dødfisken ( $P \leq 0,0001$ ) (figur 3.36).

Gjellene og nyrene hadde ein relativ høg prevalens for PMCV ved alle tre uttaka. Stor spreiring i Ct-verdiar mellom dei positive individa, og ingen signifikante forskjellar mellom uttaka for verken gjelleprøvane (figur 3.37) eller nyreprøvane (figur 3.38).

Alle analyserte gjelleprøvar var positive for *Cand. B. cysticola*, med høgare densitet hos fisken som døydde under behandlinga samanlikna med etter behandling ( $P \leq 0,01$ ) (figur 3.39). Ved analyse av nyreprøvane var densitet høgast hos dødfisken ( $P \leq 0,0001$ ) (figur 3.40).

Alle gjelleprøvane hadde ein prevalens på 100 % for *Cand. P. salmonis*, med signifikant høgast densitet ved uttaket etter behandling (Før  $P \leq 0,01$  og Død under  $P \leq 0,0001$ ) (figur 3.41).

Fisken hadde og ein prevalens på 100 % for bakterien *Cand. S. salmonis* før behandling og hos dødfisken. Etter behandling var prevalensen 93 % (figur 3.42). Ingen signifikant forskjell mellom uttaka.

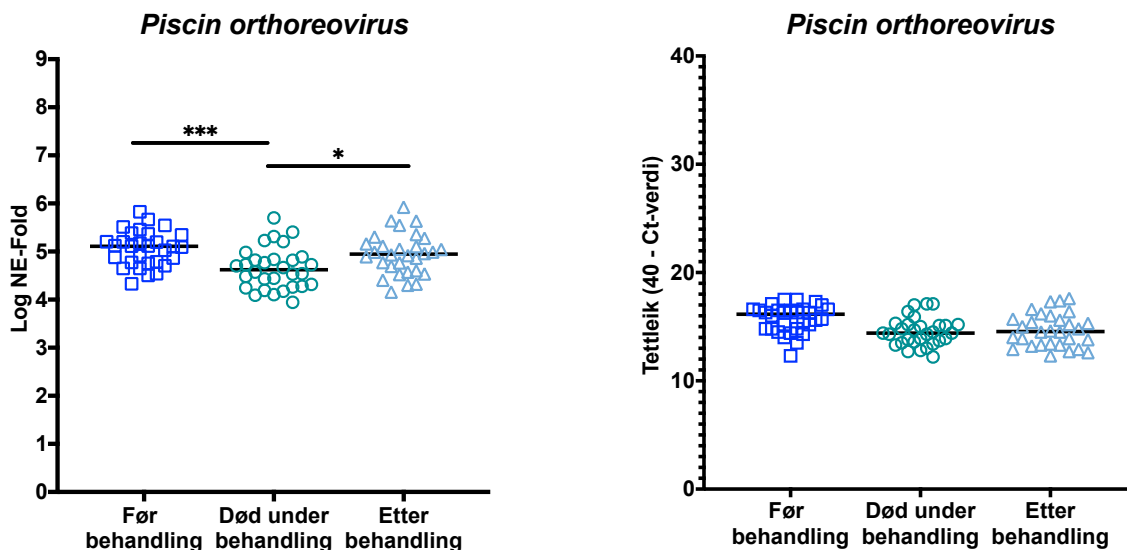
Alle analyserte gjelle- og nyreprøvar var positive for *P. theridion*, med signifikant høgast densitet hos fisken som døydde under behandling (Før  $P \leq 0,01$  og etter  $P \leq 0,0001$ ) (figur 3.43).

100 % prevalens for *I. salmonis*, med signifikant høgast densitet ved uttaket før behandling (Død under  $P \leq 0,001$  og etter  $P \leq 0,01$ ) (figur 3.44).

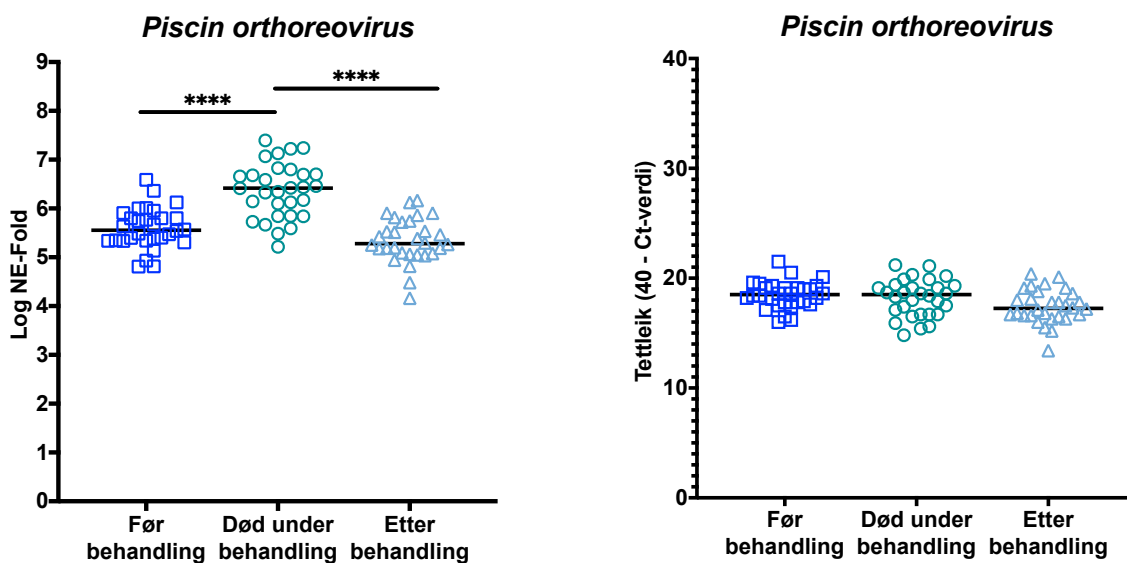
Ved uttak før og etter behandling var prevalensen 100 % for *P. perurans*. For dødfisken var prevalensen 87 %, og densitet var signifikant lågast ved dette uttaket (Før  $P \leq 0,0001$  og etter  $P \leq 0,01$ ) (figur 3.45).

Dei resterande patogena denne fisken var positiv for hadde låg prevalens og/eller låg densitet, og er lista i tabell 3.4.

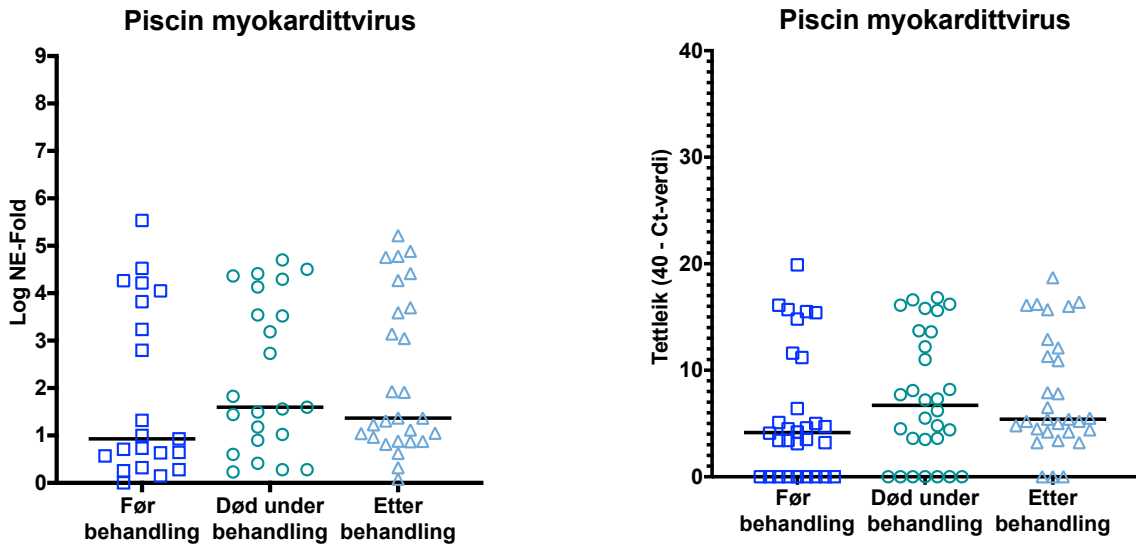
Diversitetsindeksen var 4,8 både ved uttaket før og etter behandling. For dødfisken var den 5,2.



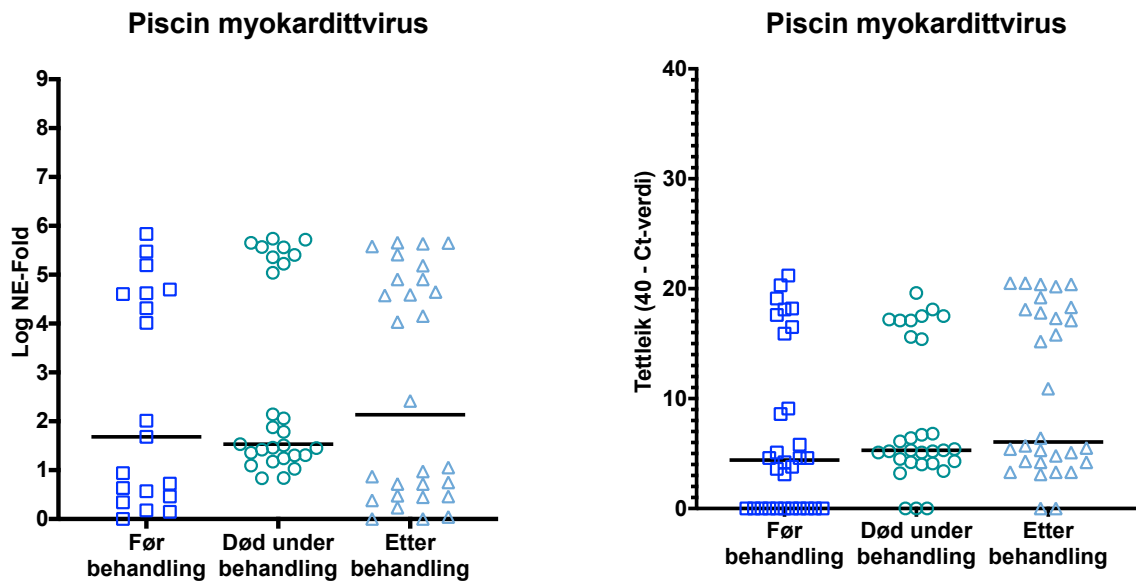
**Figur 3.35.** Densitet av *PRV*-1 for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*  $P \leq 0,05$  og \*\*\*  $P \leq 0,001$ .



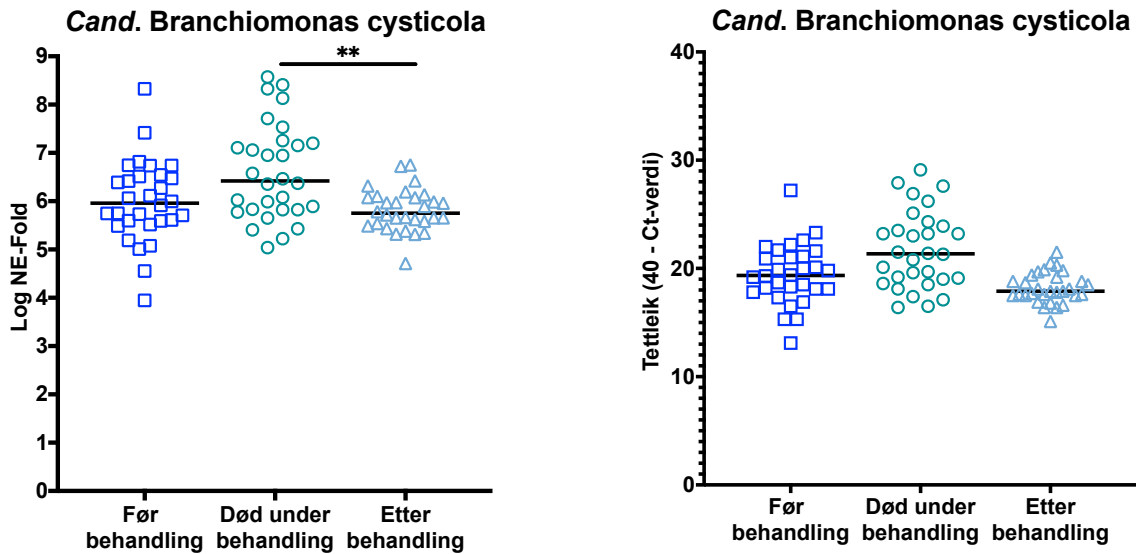
**Figur 3.36.** Densitet av *PRV*-1 for kvart enkelt individ ved analyse av nyre ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .



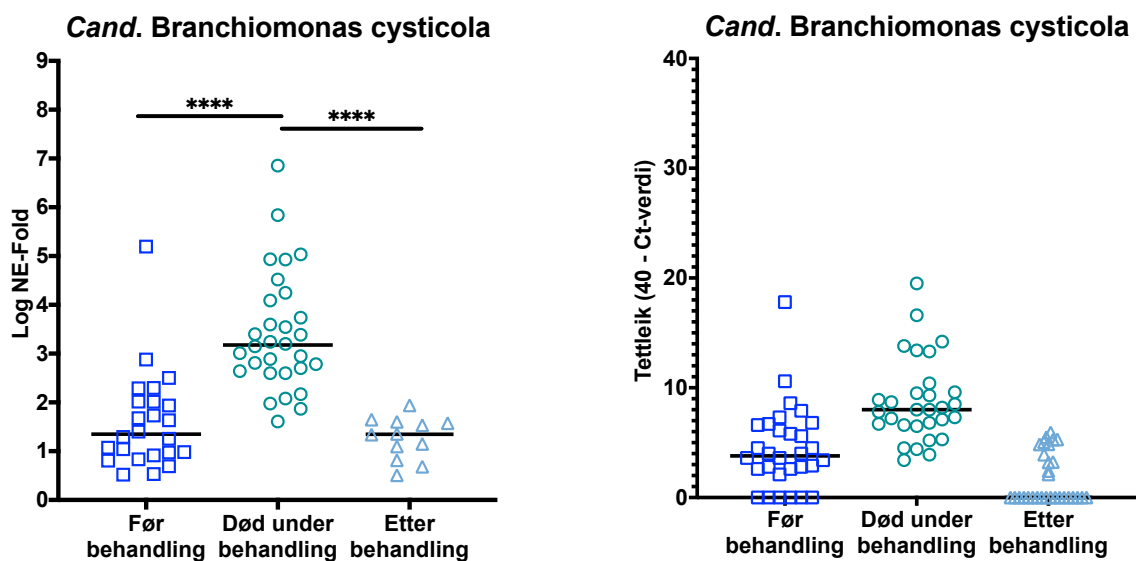
**Figur 3.37.** Densitet av PMCV for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 70, 77 og 90 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak.



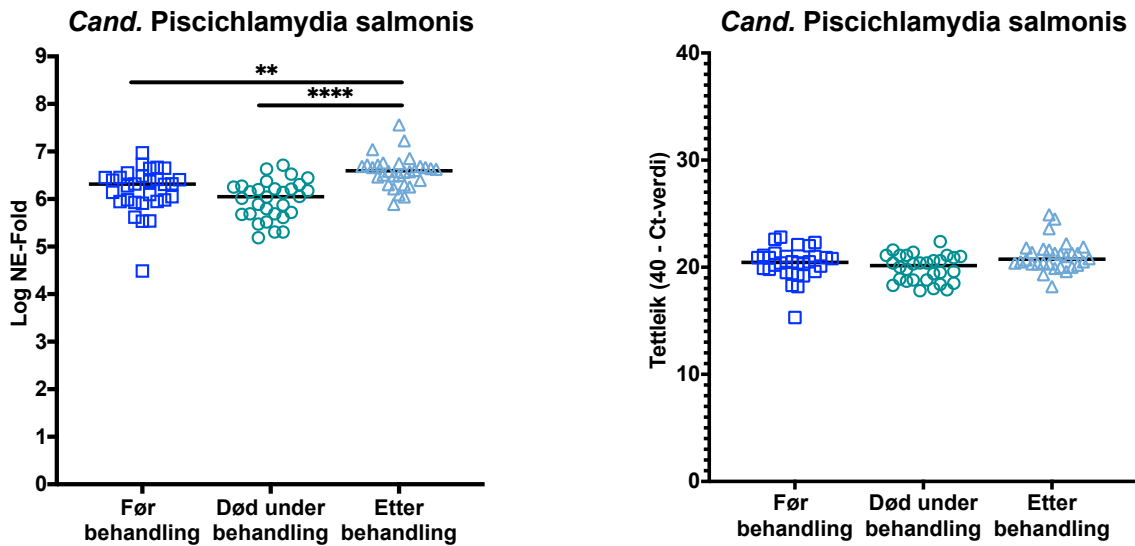
**Figur 3.38.** Densitet av PMCV for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 63, 90 og 93 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak.



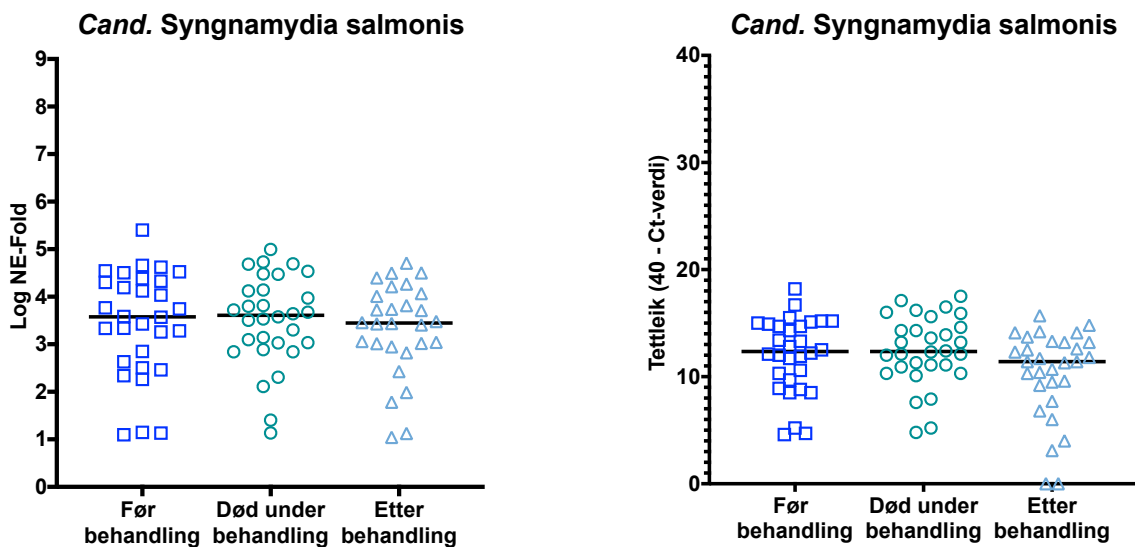
**Figur 3.39.** Densitet av *Cand. B. cysticola* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellevev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*  $P \leq 0,01$ .



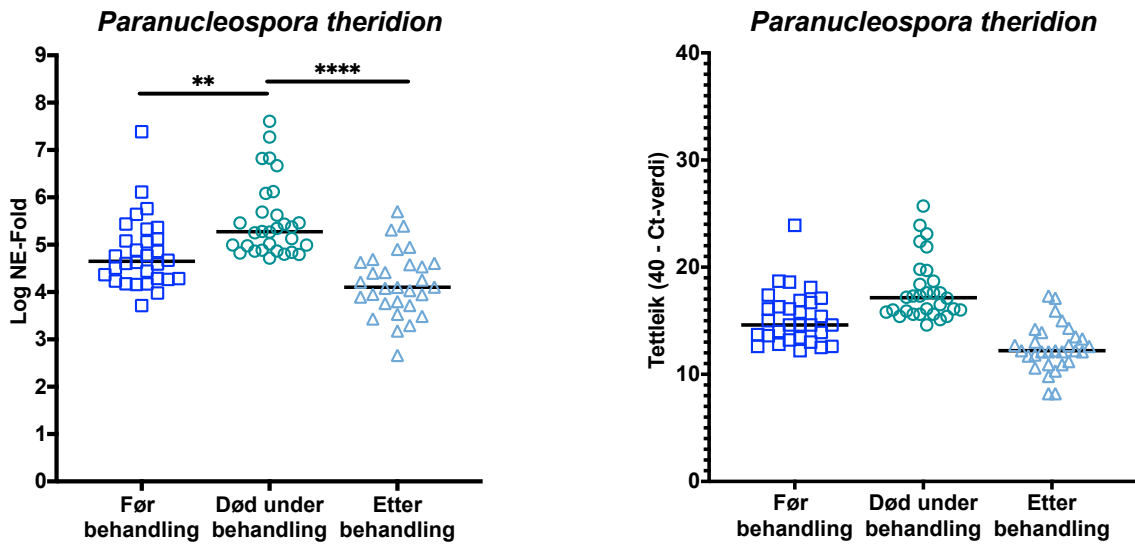
**Figur 3.40.** Densitet av *Cand. B. cysticola* for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 80, 100 og 40 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .



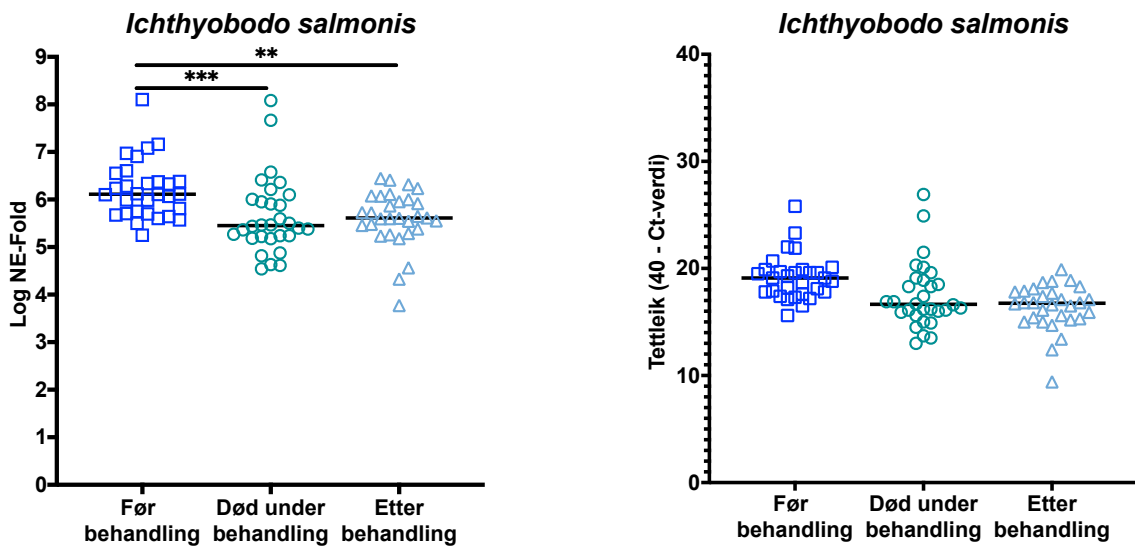
**Figur 3.41.** Densitet av *Cand. P. salmonis* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\* P≤ 0,01 og \*\*\*\* P≤ 0,0001.



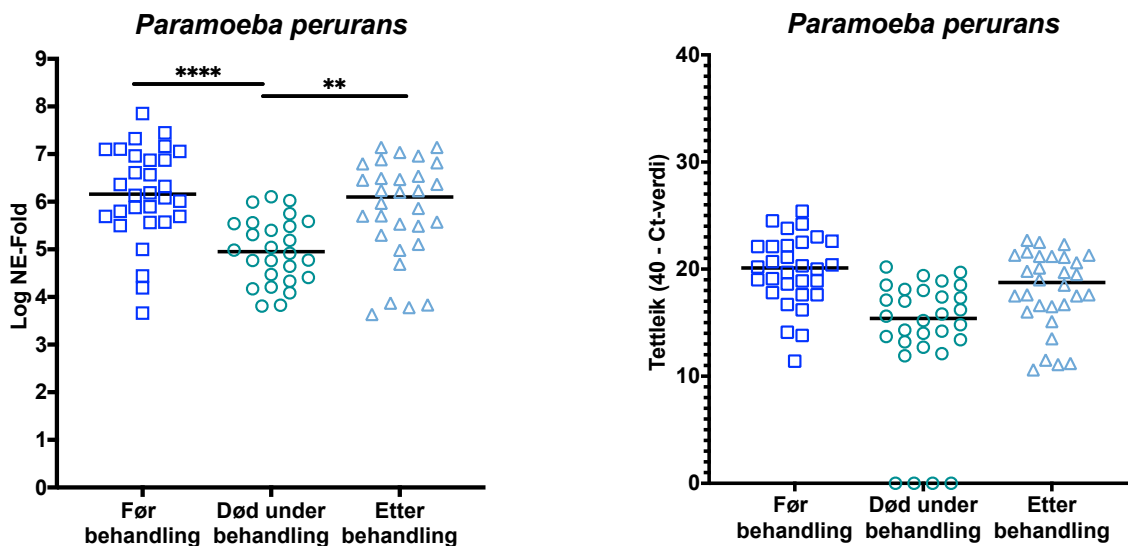
**Figur 3.42.** Densitet av *Cand. S. salmonis* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100, 100 og 93 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak.



**Figur 3.43.** Densitet av *P. theridion* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*  $P \leq 0,01$  og \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .



**Figur 3.44.** Densitet av *I. salmonis* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved alle uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\*  $P \leq 0,01$  og \*\*\*  $P \leq 0,001$ .



**Figur 3.45.** Densitet av *P. perurans* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved tre prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100, 87 og 100 % ved dei tre uttaka. N= 30 for kvart uttak. \*\* P≤ 0,01 og \*\*\*\* P≤ 0,0001.

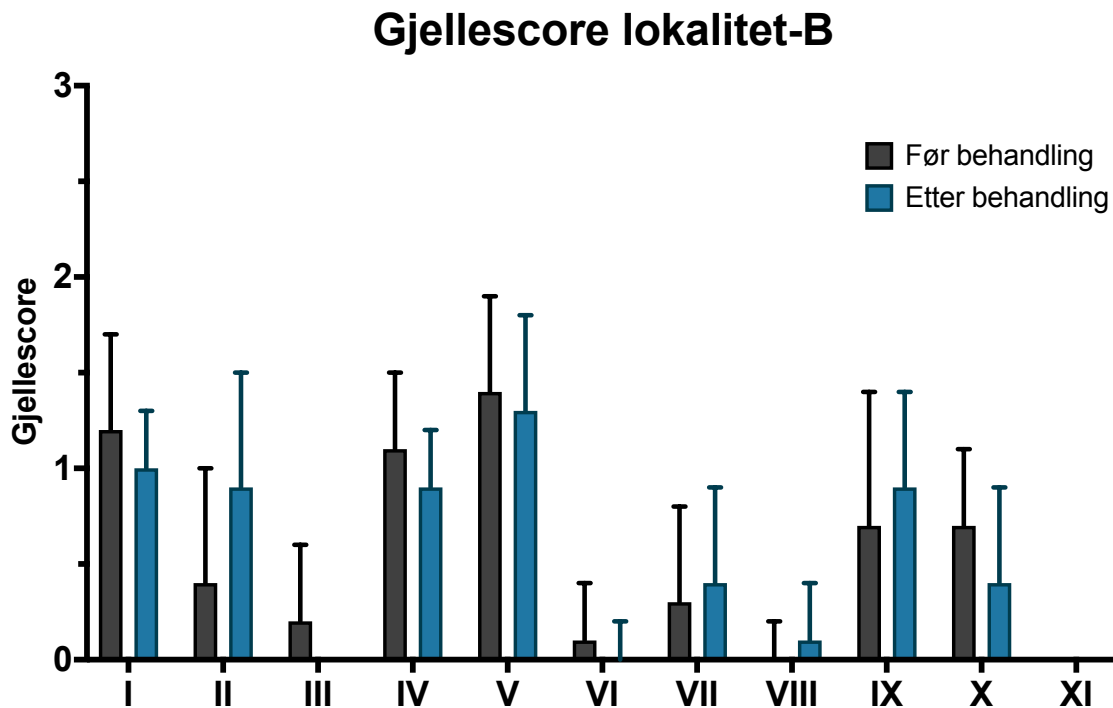
**Tabell 3.4.** Påvising av ILAV, SGPV, *P. pseudobranchicola*, *Tenacibaculum* spp. og *T. maritimum* med låg densitet og/eller låg prevalens. Tre prøveuttak. Syner gjennomsnittleg Ct-verdi ved alle tre uttaka for kvart patogen, i tillegg til rangen for dei positive Ct-verdiane og prevalensen. Nokre analyserte gjelleprøvar (Gj) og nokre analyserte nyreprøvar (Ny). N= 30 for kvart patogen ved kvart uttak.

	Før behandling			Død under behandling			Etter behandling		
	Ct-verdi		%	Ct-verdi		%	Ct-verdi		%
	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens
ILAV (Gj)	33,9	31,3 - 35,6	10	35,3	34,3 - 36,4	7	36,0	35,3 - 36,7	17
ILAV (Ny)	Neg	Neg	Neg	35,5	35,5	3	Neg	Neg	Neg
SGPV (Gj)	34,8	28,0 - 38,0	27	30,9	25,7 - 35,7	23	35,8	35,8	3
<i>P. pseudobranchicola</i> (Gj)	33,3	30,1 - 37,0	60	33,6	29,0 - 37,5	70	33,7	27,8 - 37,5	20
<i>Tenacibaculum</i> spp. (Gj)	31,8	28,9 - 34,0	57	31,0	28,9 - 34,3	77	33,3	30,3 - 35,6	80
<i>Tenacibaculum</i> spp. (Ny)	34,3	28,0 - 36,3	33	-	-	-	35,8	34,3 - 37,4	23
<i>T. maritimum</i> (Gj)	35,4	31,3 - 36,5	47	34,7	30,8 - 36,4	90	36,4	33,6 - 39,3	27



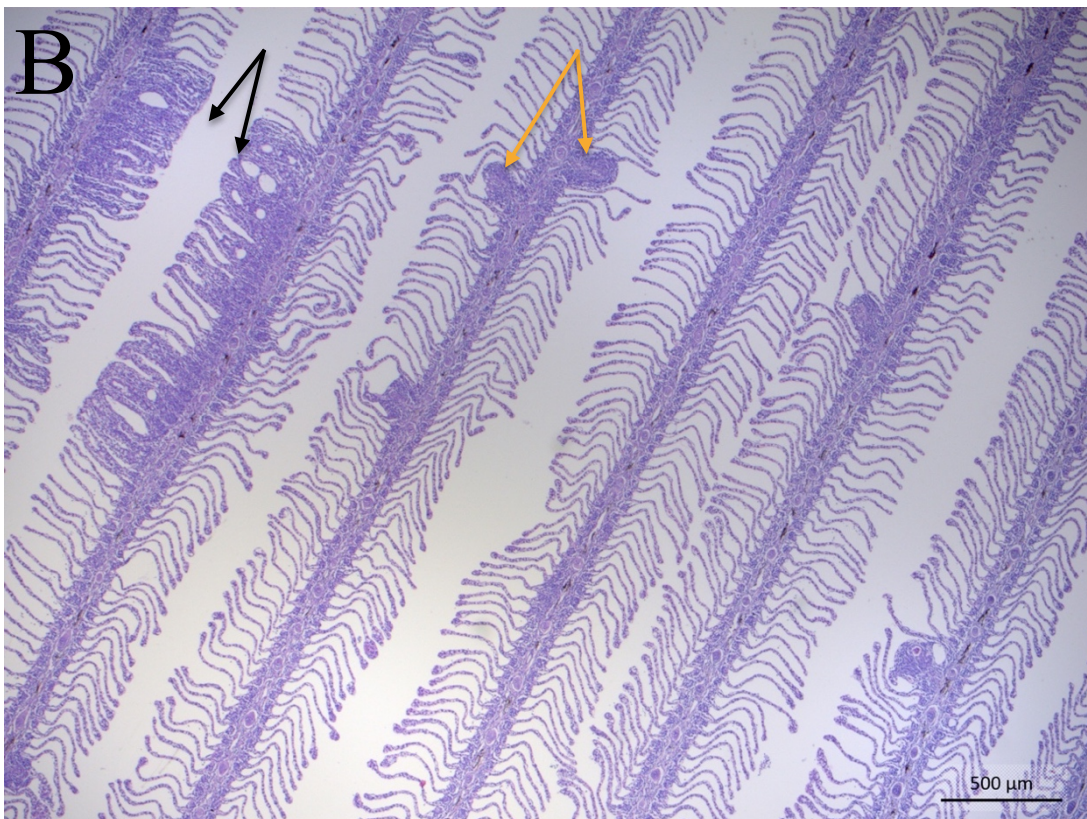
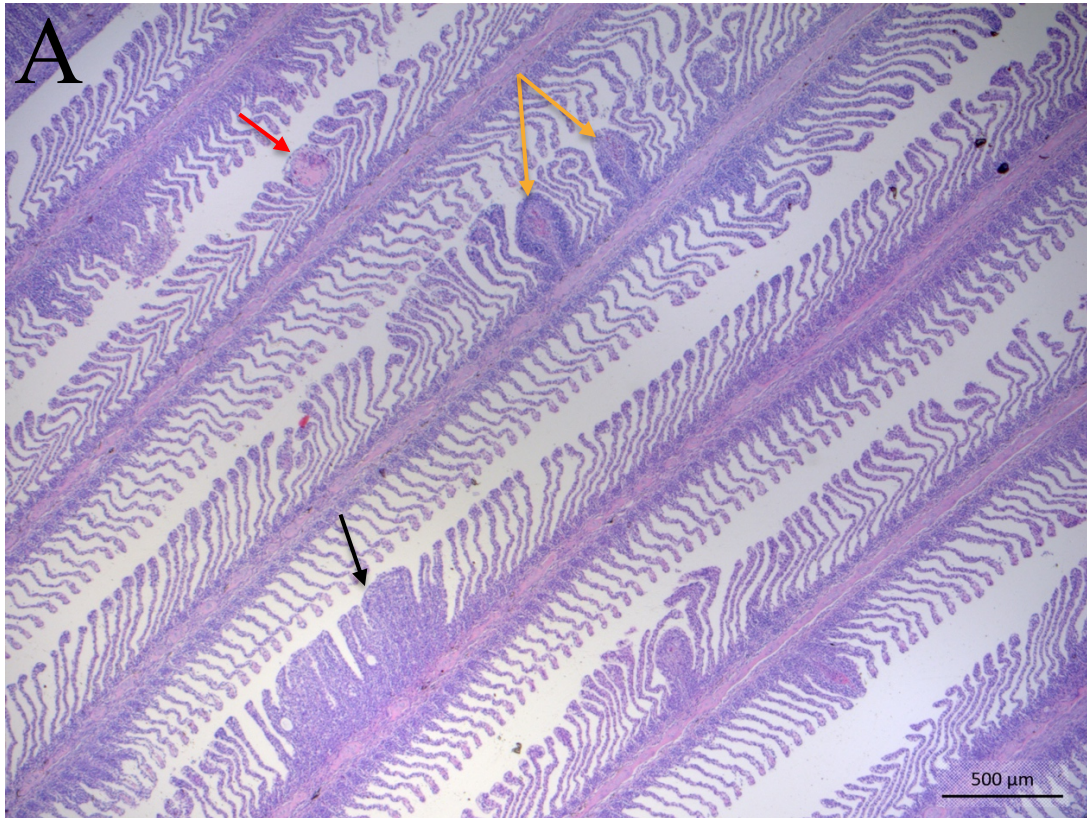
### 3.3.2 Histopatologi

I hovudsak vart det registrert endringar tilsvarende score 1 og score 2, som vert rekna som milde og moderate endringar (figur 3.46). Dei same endringane vart registrert både ved uttaket før og etter behandling med Thermolicer. Med unntak av klubbing var det ingen utvikling av gjellescore etter behandling.

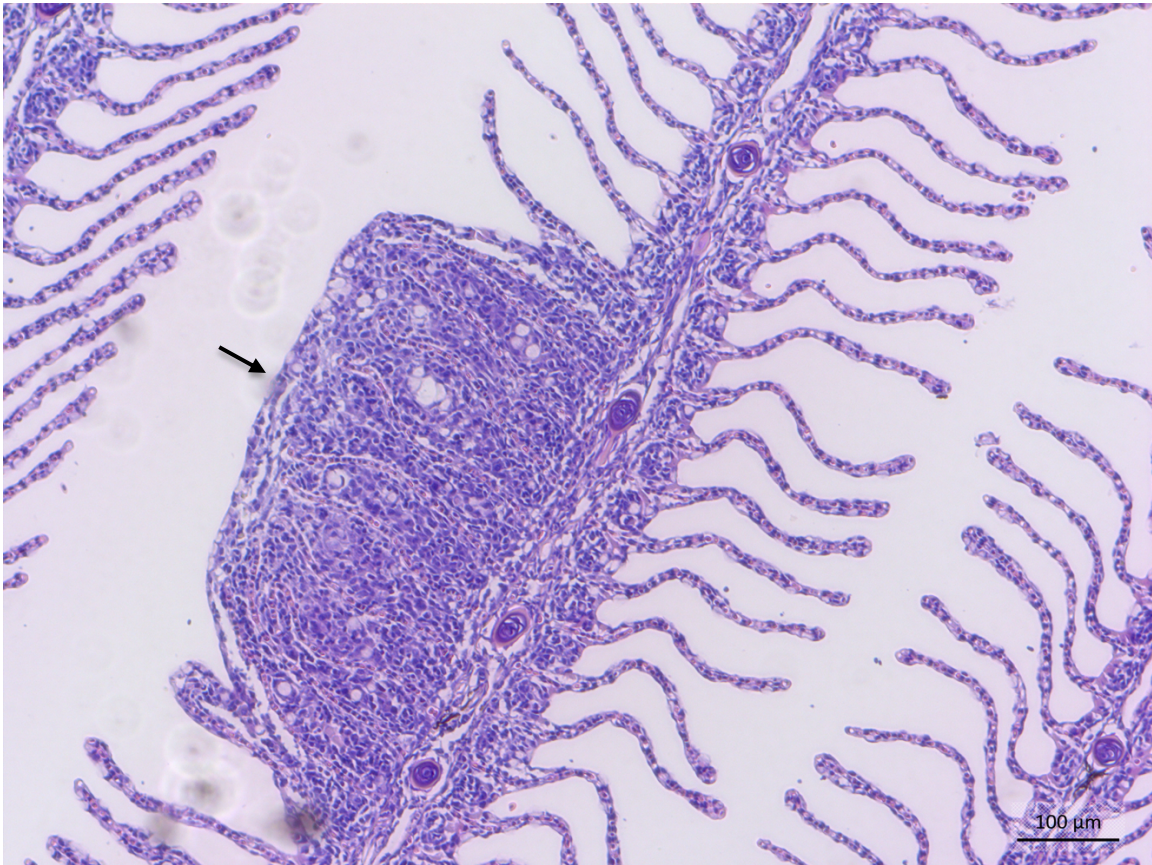


**Figur 3.46.** Gjennomsnittleg gjellescore for dei elleve patologiske endringane inkludert i dette studiet, ved uttak før og etter behandling med Thermolicer på lokalitet-B. **I:** slimcellehyperplasi, **II:** klubbing, **III:** lifting, **IV:** hypertrofi av epitelceller, **V:** hyperplasi av epitelceller, **VI:** fortjukka distal primærlamelle, **VII:** fersk aneurisme, **VIII:** blødande aneurisme, **IX:** gammal aneurisme, **X:** inflammasjon og **XI:** nekrose. Gjellescore frå 0-3. Feilfelte syner standardavviket mellom prøvane. N= 30 for begge uttaka.

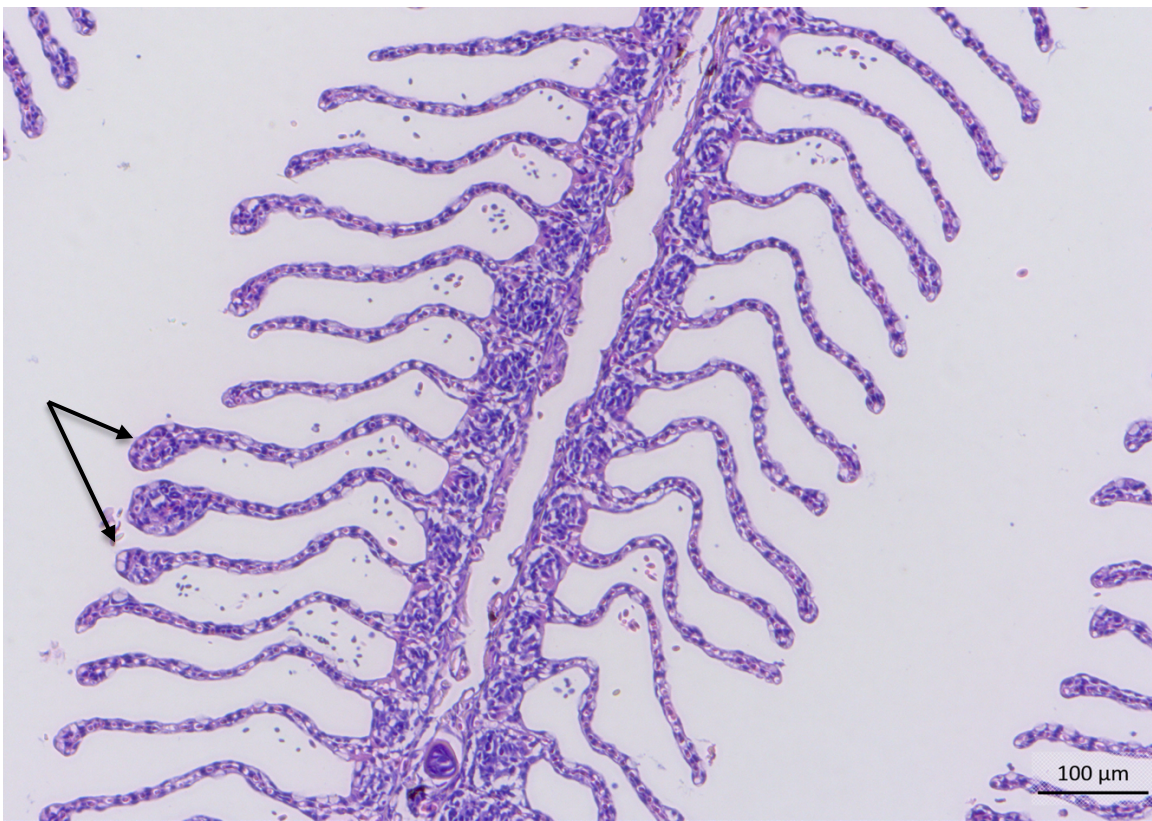
Alt undersøkt gjellevev, både før og etter behandling, hadde områder med patologiske endringar (figur 3.47). Hovudfunna var slimcellehyperplasi og samanvoksing av sekundærlameller som følgje av hypertrofi og hyperplasi av epitelceller og inflammasjon (figur 3.48), i tillegg til eldre aneurismar. Det vart og observert klubbing (figur 3.49) og ferske aneurismar hos ein del fisk ved begge uttaka.



**Figur 3.47.** Histologi som syner standarden for undersøkt gjellevev frå begge uttaka. **A:** før behandling, fisk nr. 8 og **B:** etter behandling, fisk nr. 62. Områder med lokal hyperplasi og hypertrofi av epitelceller samt inflammasjon som har ført til samanvoksingar av sekundærlameller (svart pil). I tillegg til eldre aneurismar (oransje pil) og ein fersk aneurisme (raud pil) (A). Klubbing i dei mindre påverka områda. Stav: 500  $\mu\text{m}$ .



**Figur 3.48.** Histologi som syner lokal samanvoksing av sekundærlameller som følge av inflammasjon og hypertrofi og hyperplasi av epitelceller (pil). Fisk nr. 70 etter behandling. Stav: 100 μm.



**Figur 3.49.** Histologi som syner mindre påverka områder. Enkelte sekundærlameller med klubbing (pil). Fisk nr. 64, etter behandling. Stav: 100 μm.

### 3.4 Avlusing med Optilicer på lokalitet-C

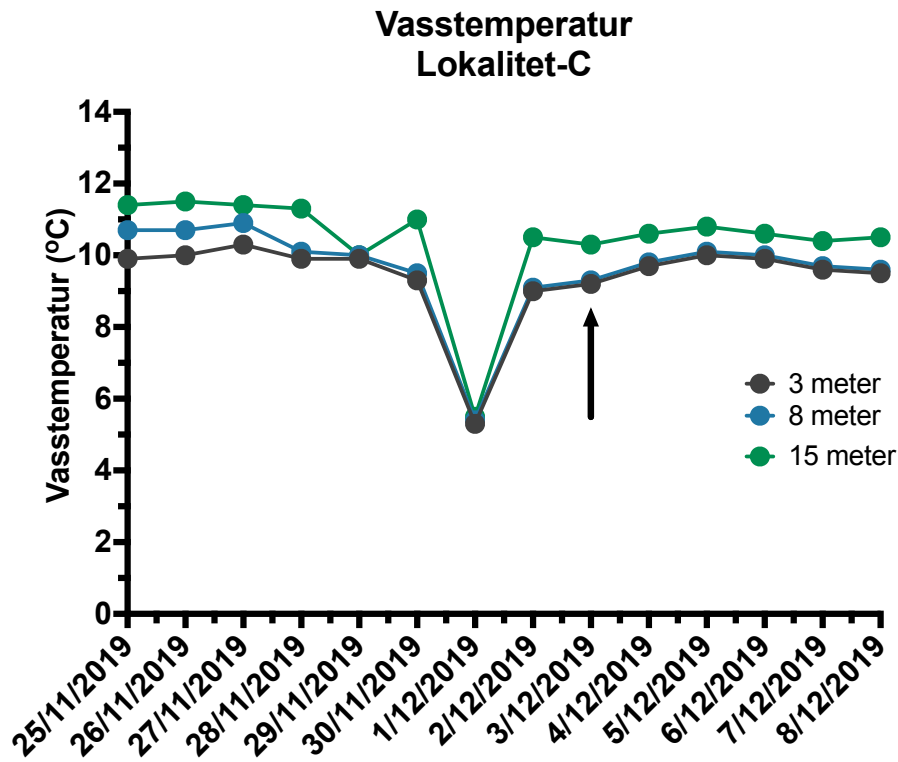
Regnbogauren hadde ei gjennomsnittsvekt på  $2185 \pm 769$  gram og ei gjennomsnittslengd på  $54 \pm 8$  cm ved fyrste prøveuttak, fire dagar før behandling. Det vart tald eit gjennomsnitt på 1,1 mobile lus per fisk med ein variasjon frå 0-5 før behandlinga. I hovudsak var fisken fin og rund før behandlinga, med raude gjeller utan makroskopiske lesjonar (figur 3.50). Ein del av fisken hadde raude buk- og gattfinner (figur 3.51). I tillegg var 23 % av den undersøkte fisken kjønnsmodne hannar. To fisk hadde sår og ein hadde blødning på innsida av gjelleloket. Temperaturen i sjøen låg i hovudsak mellom 9,0 og 11,6 °C i veke før og etter behandling (figur 3.52), og oksygenmetninga mellom 67 og 111 % i same periode (figur 3.53). Saliniteten var tilnærma fullt sjøvatn (27-31 ‰).



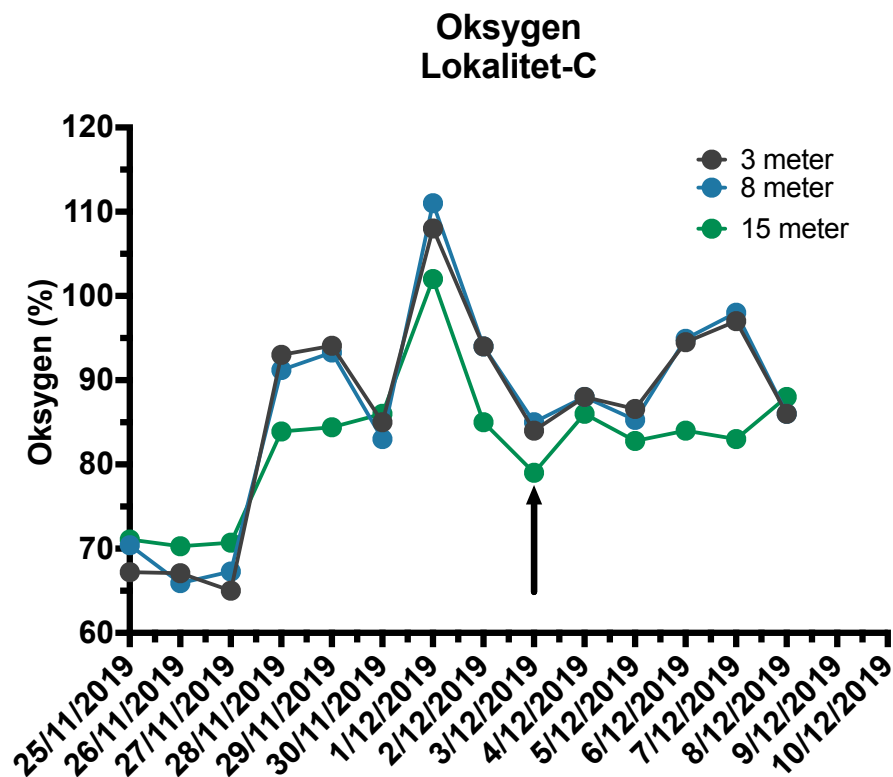
**Figur 3.50.** Det vart i hovudsak registrert fin, rund regnbogaure i forkant av behandling med Optilicer. Med noko teikn til raude bukfinner.



**Figur 3.51.** Regnbogaure før behandling med Optilicer. Raude bukfinner og gattfinne.

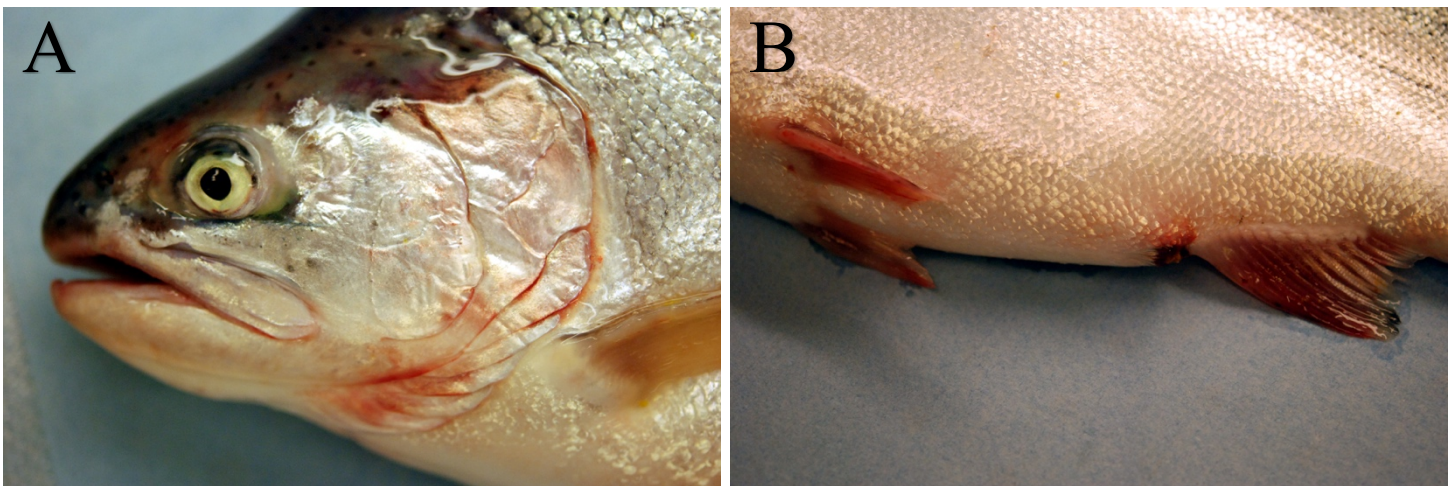


Figur 3.52. Temperaturen i sjøen med daglege registreringar frå ei veke før behandling og fram til ei veke etter behandling på lokalitet-C. Registreringar 3, 5 og 15 meter under vassoverflata. Pil syner behandlingsdagen.



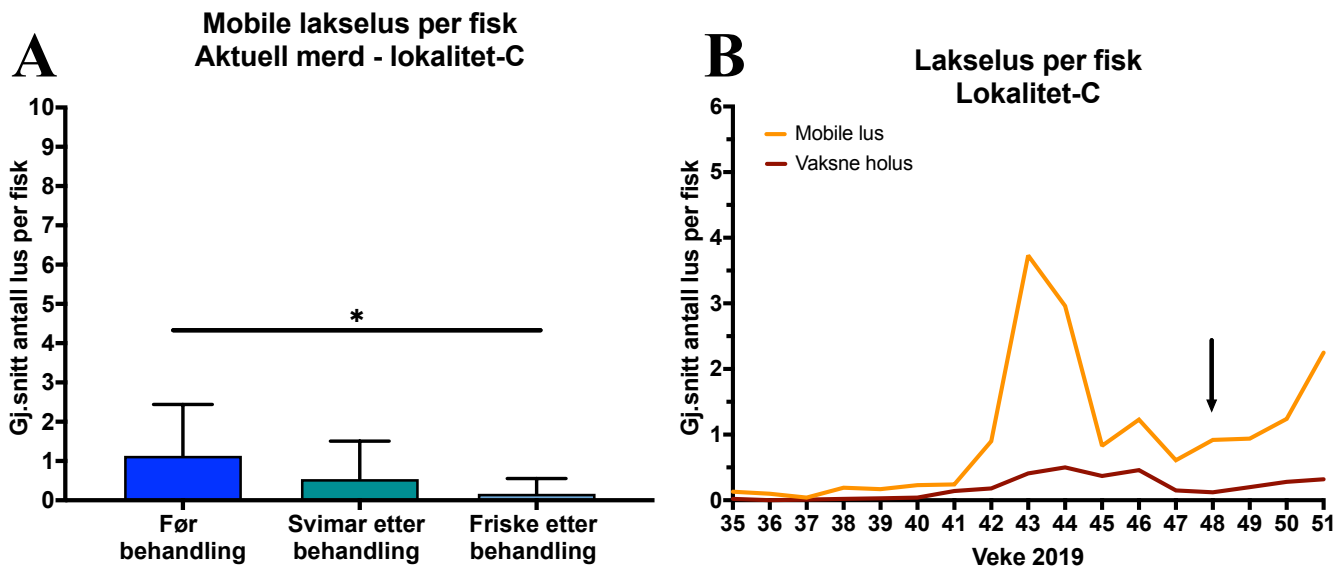
Figur 3.53. Oksygen i sjøen med daglege registreringar frå ei veke før behandling og fram til ei veke etter behandling på lokalitet-C. Registreringar 3, 5 og 15 meter under vassoverflata. Pil syner behandlingsdagen.

Det vart opplyst om høg dødelegheit i samband med behandlinga som følgje av ein feil under trenginga og pumpinga i forkant av sjølve behandlinga. Eksakt dødstal er ukjent då lokaliteten ikkje ville oppgje dette. Sidan det i hovudsak vart motteke fryste hovud frå fisken som døydde under behandlinga, vart registreringa av ytre endringar avgrensa. Det vart likevel registrert koagulert blod i pericardialhola hos ein del fisk. I tillegg vart det registrert koagulert blod i pericardialhola hos fem av dei 13 svimarane etter behandling. Ein fisk hadde frynsete gjeller, ein nekrose på gjellene og ein hadde aneurismar på gjellene. Det vart registrert ein kjønnsmoden hannfisk blant dei 13 svimarane etter behandling. Store delar av denne fisken var raud i hovudregionen (figur 3.54A), på bukfinnene og rundt anus (figur 3.54B). Ein av dei tilsynelatande friske fiskane etter behandling, hadde skade på gjelleloket.



**Figur 3.54.** Regnbogeaure (svimar) etter behandling med Optilicer på lokalitet-C. **A:** raud i hovudregionen og **B:** raude bukfinner og gattfinne.

Det vart ikkje tald lus på fisken som døydde under behandlinga, sidan det berre var hovud som vart sendt til FDRG. Det vart derimot tald på fisken etter behandling. Svimarane hadde i gjennomsnitt 0,5 mobile lus per fisk, medan dei tilsynelatande friske fiskane etter behandling hadde 0,2 mobile lus per fisk (figur 3.55A). Signifikant reduksjon av antall mobile lakselus hos dei tilsynelatande friske fiskane etter behandling, samanlikna med før behandling ( $P \leq 0,05$ ). Innrapporterte lusetal frå lokaliteten til BarentsWatch syner ein svak auke i både gjennomsnittleg antall mobile lakselus og vaksne holus per fisk i veka etter behandling (figur 3.55B). Dette skuldast at lusetala gjeld heile lokaliteten, medan berre delar av lokaliteten vart behandla denne veka.



**Figur 3.55.** Gjennomsnittleg antall lakselus per fisk på lokalitet-C i samband med avlusing med Optilicer. **A:** Gjennomsnittleg antall mobile lus, talt på fisk før behandling, og på svimara og tilsynelatande friske etter behandling.  $N=30$  før behandling,  $N=13$  for svimara etter behandling og  $N=12$  for tilsynelatande friske etter behandling. Feilfelte syner standardavviket (SD) mellom prøvane. \*  $P \leq 0,05$ . **B:** Gjennomsnittleg antall lus på heile lokalitet-C, kvar veke i ein periode før og etter behandling (tal henta frå BarentsWatch). Den oransje linja syner antall mobile lus og raud linje antall vaksne holus. Svart pil syner veka avlusinga i dette studiet vart gjennomført.

### 3.4.1 Kartlegging av mikroparasittar

#### Effektivitetstest av to assay

Effektivitetstest vart utført for assaya OmELF og PER. OmELF (elongeringsfaktoren til regnbogeaure) hadde ein effektivitet på 2,01. PER (assay for X-celle liknande parasitt) hadde ein effektivitet på 2,06. Standardkurve for dei to assaya (appendiks, figur 7.3-7.4).

Alle dei 85 analyserte prøvane var negative for virusa ILAV, PRV-3, PMCV, *Piscin novirhabdovirus (VHSV)* og SGPV. I tillegg til bakteriane *Cand. P. salmonis* og *Candidatus Clavichlamydia salmonicola*, og parasittane *P. pemaquidensis* og *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKX).

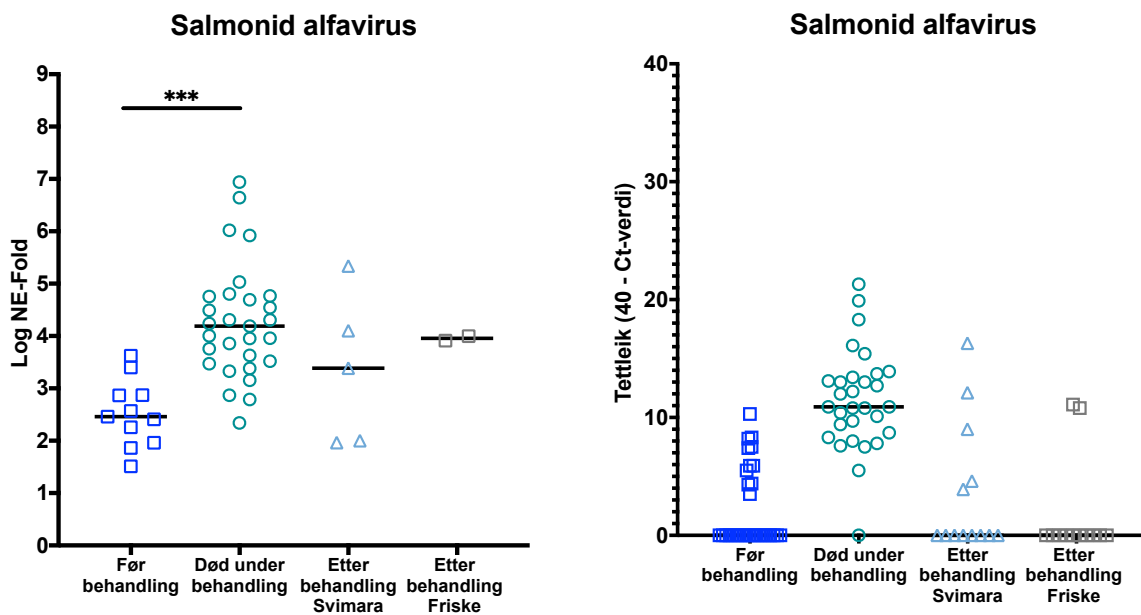
Ved analyse av gjelle- og nyrevev var fisk frå denne lokaliteten positive for følgjande patogen: SAV, PRV-1, IPNV, *Cand. B. cysticola*, *Cand. S. salmonis*, *Tenacibaculum spp.*, *T. maritimum*, *P. theridion*, *P. perurans*, *I. salmonis* og X-celle liknande parasitt. Analyse av nyrevev for SAV gav høgast prevalens hos dødfisken (97 %), og signifikant høgast densitet ved dette uttaket, samanlikna med før behandling (Før  $P \leq 0,001$ ) (figur 3.56). For dei tre andre gruppene var prevalensen under 40 %.

Prevalensen var 100 % for *Cand. B. cysticola* (figur 3.57), *Cand. S. salmonis* (figur 3.58), *P. theridion* (figur 3.59), *P. perurans* (figur 3.60) og *I. salmonis* (3.61) ved analyse av gjellevev. For *Cand. B. cysticola* var densiteten signifikant høgare hos dødfisken samanlikna med før behandlinga og dei tilsynelatande friske fiskane etter behandling (Før  $P \leq 0,001$  og etter  $P \leq 0,05$ ).

Analyse av X-celle-liknande parasitt i nyrevev gav ein prevalens på 90 % for dødfisken, 8 % for svimara etter behandling og 0 % for dei to andre uttaka (figur 3.62).

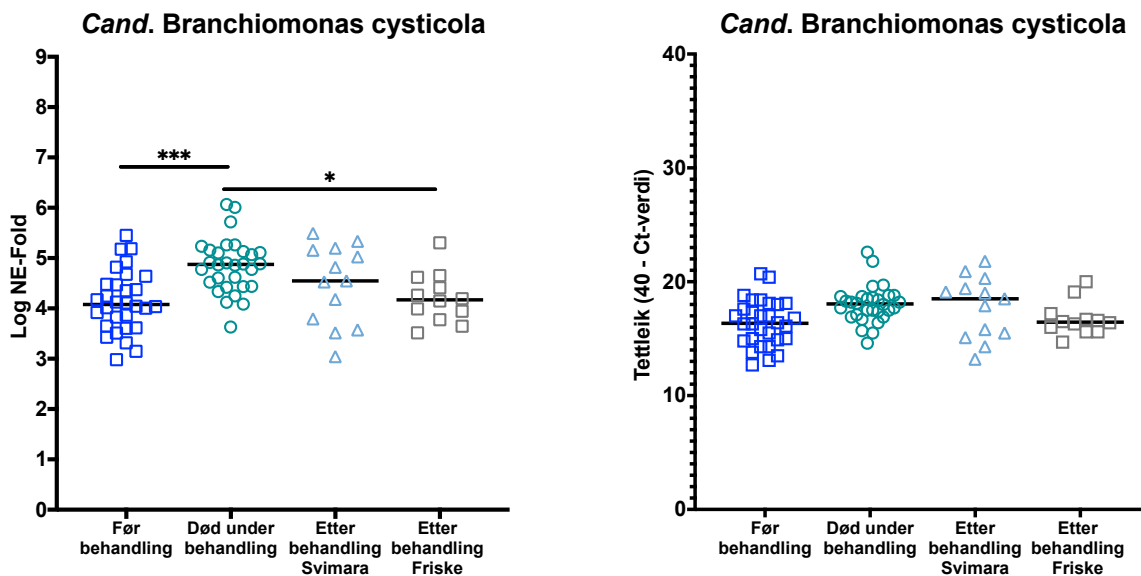
Dei andre patogena denne fisken var positiv for hadde låg densitet og/eller låg prevalens og er lista i tabell 3.5.

Diversitetsindeksen var 3,4 før behandling og 3,8 hos dødfisken. Etter behandling var den 3,3 hos svimarane og 3,2 hos dei tilsynelatande friske fiskane.

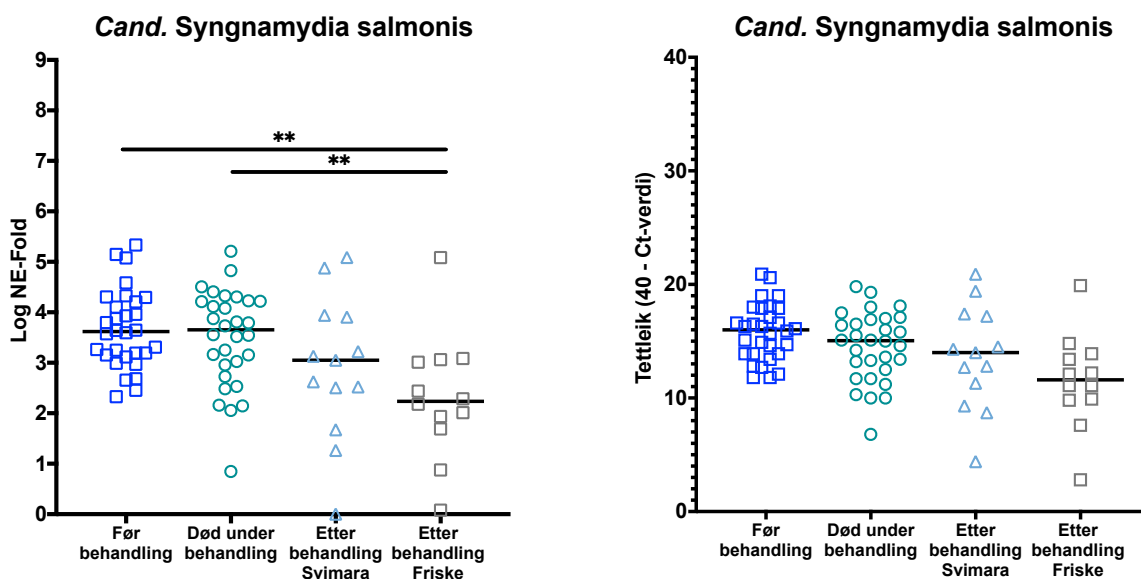


**Figur 3.56.** Densitet av SAV for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 37, 97, 38 og 17 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste. \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

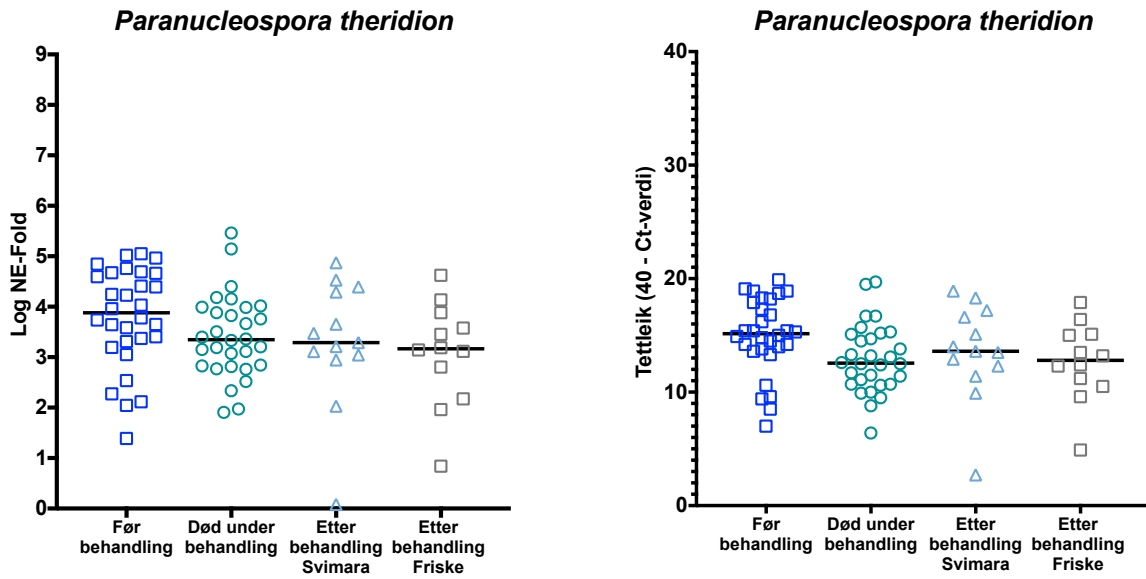




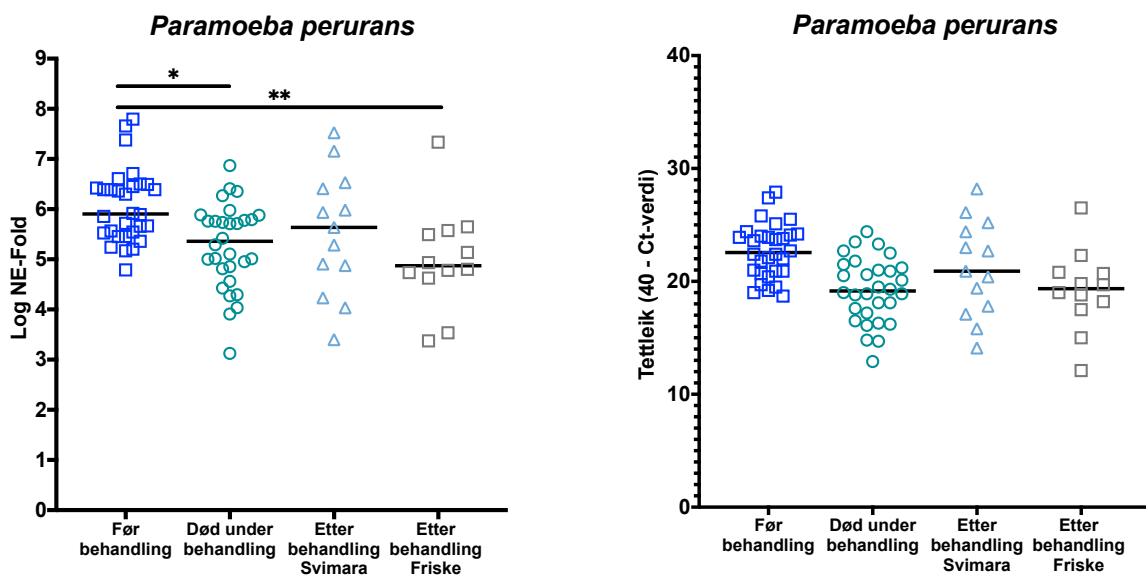
**Figur 3.57.** Densitet av *Cand. B.cysticola* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste. \* P≤ 0,05 og \*\*\* P≤ 0,001.



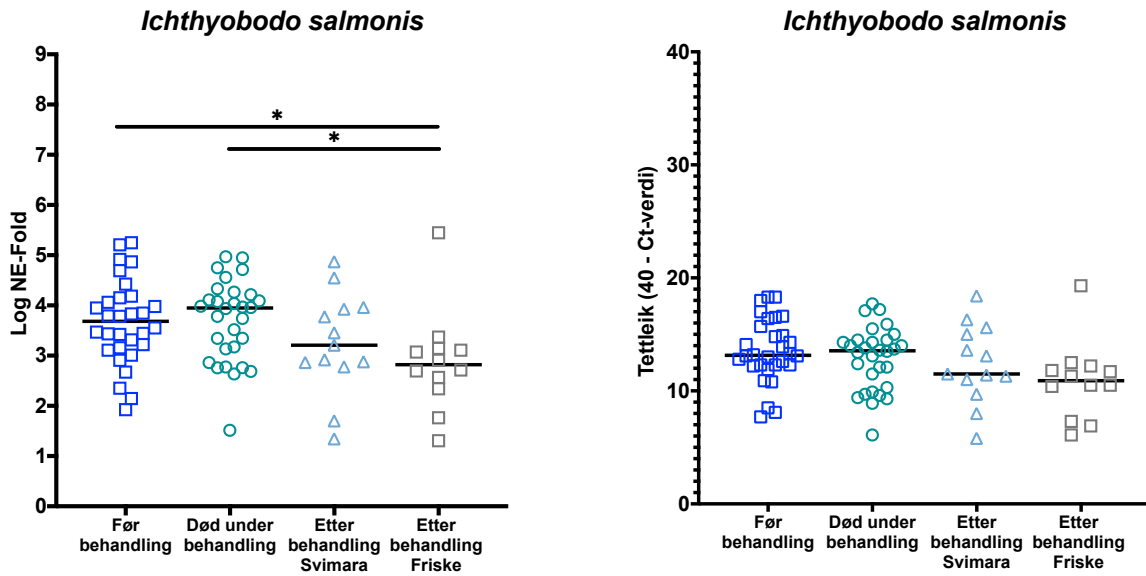
**Figur 3.58.** Densitet av *Cand. S. salmonis* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste. \*\* P≤ 0,01.



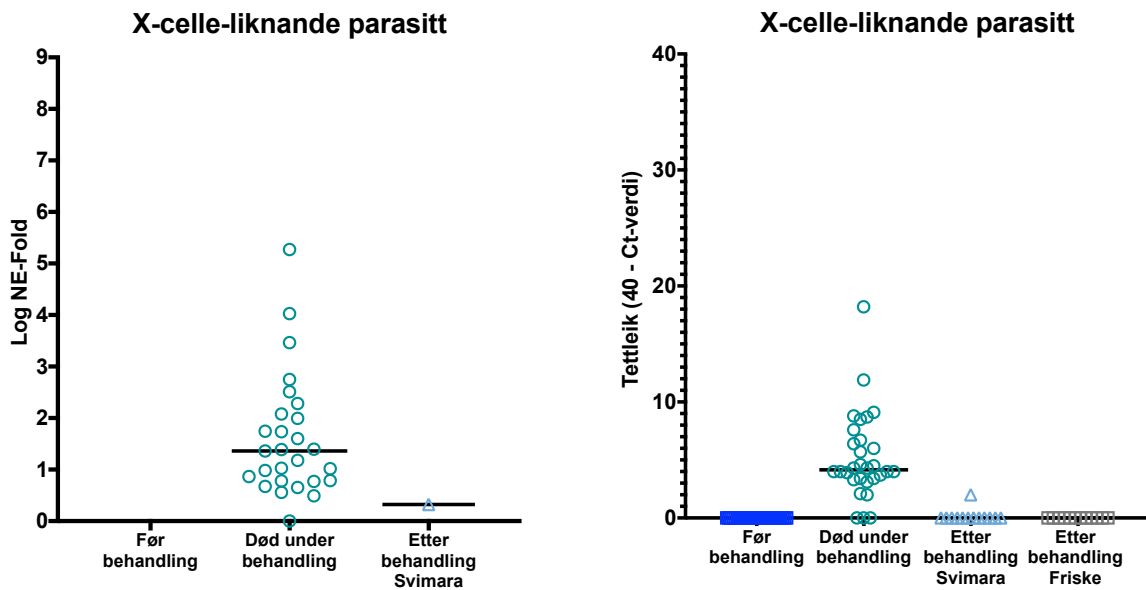
**Figur 3.59.** Densitet av *P. theridion* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste.



**Figur 3.60.** Densitet av *P. perurans* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellelev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste. \*  $P \leq 0,05$  og \*\*  $P \leq 0,01$ .



**Figur 3.61.** Densitet av *I. salmonis* for kvart enkelt individ ved analyse av gjellevev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 100 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste. \* P≤ 0,05.



**Figur 3.62.** Densitet av X-celle liknande parasitt for kvart enkelt individ ved analyse av nyrevev ved fire prøveuttak. Data er presentert som Log NE-fold og reverse Ct-verdiar (40- Ct-verdi). Ved framstilling av reverse Ct-verdiar er negative prøvar sett til 0. Den svarte linja syner medianen for kvar gruppe. Prevalensen er 0, 90, 8 og 0 % ved dei fire uttaka. N= 30 for dei to fyrste uttaka, N=13 og N= 12 for dei to siste.

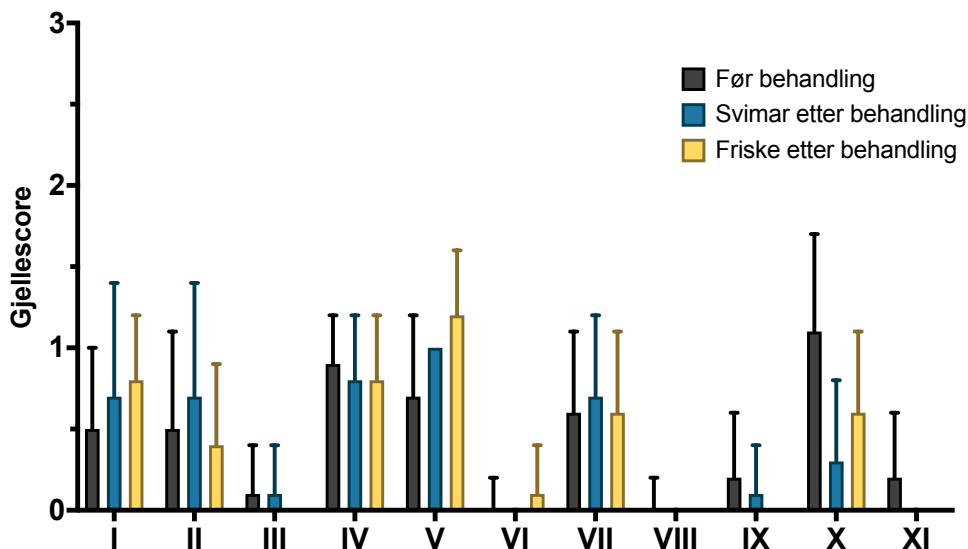
**Tabell 3.5.** Påvisning av *PRV-1*, *IPNV*, *Tenacibaculum* spp. (TB-tuf) og *T. maritimum* med låg densitet og/eller låg prevalens. Fire prøveuttak: eit før behandling, eit av fisk som døydde under behandling og to etter; eit av svimara (S) og eit av tilsynelatande frisk fisk (F). Syner gjennomsnittleg Ct-verdi ved alle fire uttaka for kvart patogen, i tillegg til rangen for dei positive Ct-verdiane og prevalensen. Nokre analyserte gjelleprøvar (Gj) og nokre analyserte nyreprøvar (Ny). N= 30 for alle patogena før behandling og død under behandling. N= 13 for svimara etter behandling og N= 12 for tilsynelatande friske etter behandling.

	Før behandling			Død under behandling			Etter behandling (S)			Etter behandling (F)		
	Ct-verdi		%	Ct-verdi		%	Ct-verdi		%	Ct-verdi		%
	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens	Gj.snitt	Range	Prevalens
<i>PRV-1</i> (Gj)	34,7	29,0-36,3	40	38,0	38,0	3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
<i>IPNV</i> (Ny)	33,0	32,7-33,4	7	33,9	33,9	3	34,0	34,0	8	33,3	32,0-34,6	17
TB-tuf (Ny)	Neg	Neg	Neg	35,1	33,6-35,7	20	32,4	29,5-36,4	69	35,4	35,4	8
TB-tuf (Gj)	32,7	29,7-35,5	70	34,0	25,3-37,7	70	27,5	23,3-32,0	100	32,6	26,1-35,2	100
<i>T. maritimum</i> (Gj)	36,4	35,2-37,2	30	36,5	36,2-36,9	13	35,9	34,7-36,8	31	36,7	36,7	8

### 3.4.2 Histopatologi

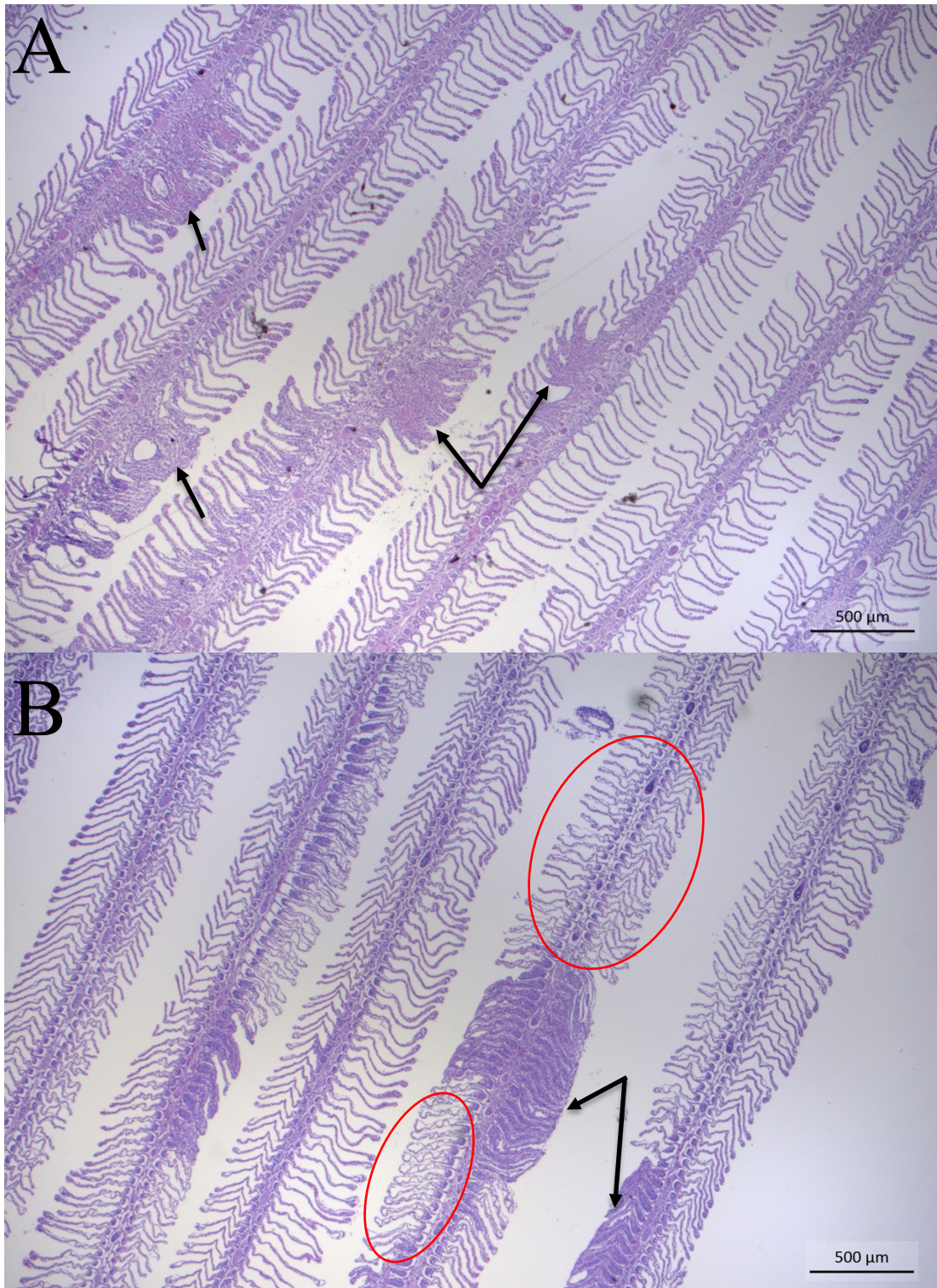
Score 1 vart i hovudsak gjeven for dei registrerte patologiske endringane for alle tre gruppene (figur 3.63). Dei same endringane vart registrert ved alle tre uttaka og det var ingen utvikling av gjellescore etter behandling med Optilicer, verken hos svimarane eller hos dei tilsynelatande friske fiskane.

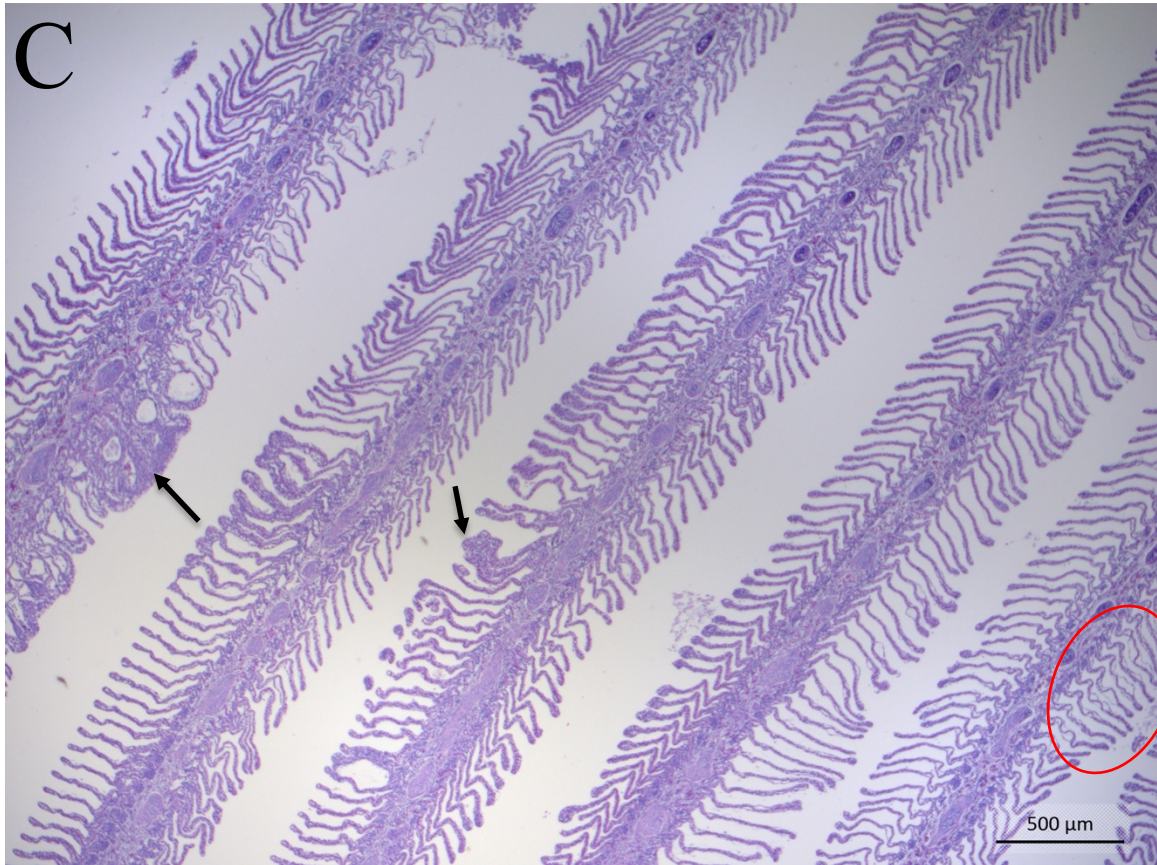
#### Gjellescore lokalitet-C



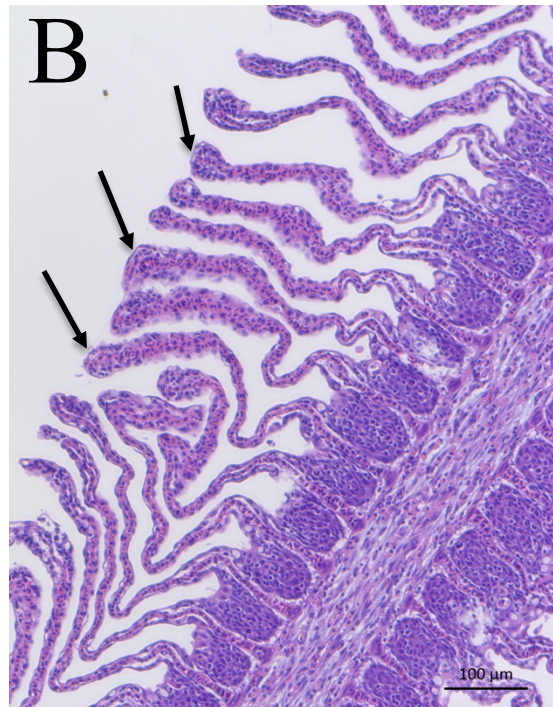
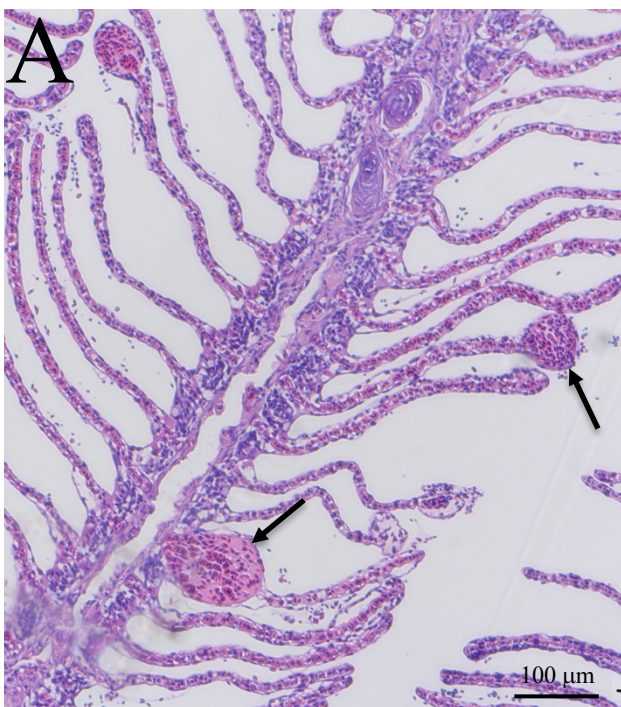
**Figur 3.63.** Gjennomsnittleg gjellescore for dei elleve patologiske endringane inkludert i dette studiet, ved uttak før og etter behandling med Optilicer på lokalitet-C. **I:** slimcellehyperplasi, **II:** klubbing, **III:** lifting, **IV:** hypertrofi av epitelceller, **V:** hyperplasi av epitelceller, **VI:** fortjukka distal primærlamelle, **VII:** fersk aneurisme, **VIII:** blødande aneurisme, **IX:** gammal aneurisme, **X:** inflammasjon og **XI:** nekrose. Gjellescore frå 0-3. Feilfelte syner standardavviket mellom prøvane. N= 30 før behandling, N= 9 for svimara etter behandling og N= 10 for tilsynelatande friske etter behandling.

Hovedfunna, både ved uttaket før behandling og dei to uttaka etter behandling (svimara og tilsynelatande friske), var områder med hypertrofi og hyperplasi av epitelceller, inflammasjon og slimcellehyperplasi (figur 3.64). I tillegg vart det registrert klubbing, lifting, ferske aneurismar (figur 3.65A) og intralamellære blødningar (figur 3.65B). Det vart observert noko autolyse i enkelte områder frå dei to gruppene etter behandling.





**Figur 3.64.** Histologi som viser standarden for undersøkt gjellevev fra alle tre uttaka. **A:** før behandling, fisk nr. 30, **B:** svimar etter behandling, fisk nr. 36 og **C:** tilsynelatende frisk etter behandling, fisk nr. 61. Områder med lokal hyperplasi og hypertrofi av epitelceller samt inflammasjon som har ført til samnavksingar av sekundærlameller (svart pil). Nokre områder med autolyse i **B** og **C** (raud ring). Stav: 500 μm.



**Figur 3.65.** Histologi som viser **A:** ferske aneurismer (pil) fra fisk nr. 26 før behandling og **B:** intralamellære blødningar (pil) fra fisk nr. 66 etter behandling (tilsynelatende frisk fisk). Stav: 100 μm.

## 4 Diskusjon

Infeksjon med lakselus har gjeve auka produksjonskostnadar for lakseoppdrettarar i Noreg dei seinare åra (Abolofia et al., 2017, Costello, 2009). Både grunna kostnadar med behandlingar, men og grunna redusert fiskevelferd og dødelegheit som følgje av luseinfeksjonen. Termiske behandlingar mot lakselus har hatt ein kraftig auke frå 2014 til 2019 (Sommerset et al., 2020), samstundes som mekaniske skadar ved avlusing vart rapportert å vere den viktigaste årsaken til redusert fiskevelferd, og etter CMS dødelegheit hos oppdrettslaks i sjøen. Med ei forventning om vekst i oppdrettsnæringa i Noreg, er det behov for meir kunnskap om termiske avlusingar. Behandlingsmetodar mot lakselus er allereie avgrensa grunna resistens mot fleire medikament (Torrissen et al., 2013, Helgesen et al., 2020). Derfor er det viktig å kartleggje effekten av allereie etablerte og effektive metodar, for å finne forbettringspunkt som kan bidra til å betre rutinar og sikre fiskevelferda.

I dette studiet vart tre termiske avlusingar i kommersiell produksjon på Vestlandet evaluert med fokus på gjellehelse. I tillegg til eit smitteforsøk der målet var å behandle patogenfri laks med varmt vatn utan den mekaniske delen, med trenging og pumping i forkant. Evalueringa av dei fire avlusingane vart basert på synleg patologi, dødelegheit, utvikling av histologisk gjellescore og kvantifisering av patogen i gjelle- og nyrevev ved hjelp av real-time RT-PCR. Det vart lagt vekt på endring i tettleik og prevalens av patogen før, under og etter behandling. I tillegg til endring av histologisk gjellescore før og etter behandling. I denne delen vil påviste mikroparasittar verta diskutert, for så å setja det opp mot histologiske funn. Før begge desse faktorane vil verta samanlikna med dødelegheit. Til slutt vil registreringar av åtferda til fisken frå smitteforsøket verta diskutert mot tidlegare studiar.

Fleire tidlegare studiar har sett på effekten av termisk avlusing, med ulike konklusjonar. Grøntvedt et al. (2015) dokumenterte at effekten av avlusing med Thermolicer gav kraftig reduksjon i antall mobile lus, på ein velferdsmessig forsvarleg måte. Roth (2016) gjennomførte eit tilsvarende forsøk med Optilicer, som synte same resultat. Poppe et al. (2018) syner til dårleg dokumentasjon av laksens smerteoppleving og patologiske funn i etterkant av behandlingar. Nye studiar av laks eksponert for varmt vatn konkluderte med at termisk avlusing er ein risiko for fiskevelferda, både grunna vevskadar og mogleg smerte (Nilsson et al., 2019, Gismervik et al., 2019).

## 4.1 Evaluering av material og metodar

I smittforsøket vart det nytta fisk med ei snittvekt rundt 235 g. I kommersiell produksjon vert vanlegvis ikkje fisken behandla mot lakselus før den er rundt 1000-3000 g, men for å få plass til nok fisk til prøvetaking vart det nytta mindre fisk i dette forsøket (Linda Andersen, pers. kom.). Fisken er likevel over smolt-stadiet, der den grunna fysiologiske og morfologiske endringar kan ha noko redusert robustheit (Stefansson et al., 2008), og er derfor representativ for å studere effekten av varmt vatn. Storleiken på fisken samsvarar i tillegg med storleiken på fisken brukt i Nilsson et al. (2019) og Gismervik et al. (2019) sitt smittforsøk på smerterespons og skadar hos atlantisk laks ved eksponering for varmt vatn.

Smittedosen i dette forsøket er høgare enn det ein normalt finn på oppdrettslaks. Utifrå tidlegare erfaringar på ILAB var smittedosen i dette forsøket sett til 25 copepodittar/fisk (Steffen Blindheim, pers. kom.). Erfaringar har vist at denne dosen fungerer bra i smittforsøk, og at ein treng noko meir lus i forsøk for å få gode data. Det finst ingen tidlige eksperimentelle forsøk som viser at varmt vatn har effekt på reduksjon av antall lus (L. Andersen, pers. kom.), derfor vart ein høgare smittedose valt for å få nok data til statistiske analysar.

Fisken vart behandla med varmt vatn 15 dpi. På dette tidspunktet, ved ein vassstemperatur på 12 °C, hadde dei fleste copepodittane utvikla seg til pre-adulte stadier (Hamre et al., 2019). Hamre et al., 2019 viste i forsøk at 85 % av lusa har utvikla seg til pre-adult I hannar etter 13,2 dpi ved 12 °C, og ved 15,4 dpi har dei tidlegaste byrja skalskifte til pre-adult II. For hoene går utviklinga noko seinare og ved 13,5 dpi vil dei tidlegaste lusa ha byrja skalskifte til pre-adult I, og ved 15,8 dpi har alle utvikla seg til pre-adult I ved 12 °C. Ved termiske avlusingar i felt har ein sett god reduksjon av mobile lakselus, men ingen klar reduksjon i antall chalimus (Grøntvedt et al., 2015, Roth, 2016). Det var derfor ynskjeleg med mobile stadier på behandlingstidspunktet. Ved registrering av antall lus per fisk, vart all synleg lus registrert men ikkje stadiebestemt. Grunna variasjonar i utviklingstid kan ein derfor ha enkelte chalimus med i registreringane. Begge dei smitta og behandla kara syner ein signifikant reduksjon av antall lus per fisk, som tyder på at behandling med varmt vatn var vellykka.

Fisken i smittforsøket vart sedert med Aqui-S før behandling med varmt vatn, for å dempe stress- og panikkåtferda og redusere oksygenforbruket. Forsøk har vist at Aqui-S kan ha ein viss effekt mot lakselus ved bruk av høge konsentrasjonar og lengre holdetid (Høgset, 2014). Konsentrasjonen som vart nytta i smittforsøket samsvarar med den eine konsentrasjonen nytta i forsøket til Høgset, 6 ppm Aqui-S. Ved denne dosen såg ein ingen døde lus ved



eksponeringstid i 45 minutt, verken ved avlesing direkte eller etter eit døgn akklimatisering. Sidan eksponeringstida her var langt under 45 minutt, og lusetalet i dei sederte og ubehandla kara var stabilt, kan ein anta at Aqui-S har lite eller ingen effekt på lusa. Dette kunne derimot vorte sjekka ved å halde lus i tilsvarande konsentrasjon Aqui-S i ei tilsvarande tid, for å sjekke om dei vart inaktiverte, men grunna avgrensa kapasitet vart ikkje dette gjort.

Ved prøveuttaka i felt (før og etter behandling på lokalitet-A og -B, og før behandling på lokalitet-C), vart pinsett og skalpell skyldt i vatn og tørka av mellom kvar fisk. Dette er ikkje standard for sterilt uttak av prøver, og kan potensielt føre til kontaminering mellom individ. Ved analyse av prøvane såg ein derimot negative individ mellom individ med låge Ct-verdiar, noko som tyder på at kontaminering mellom individ var minimal.

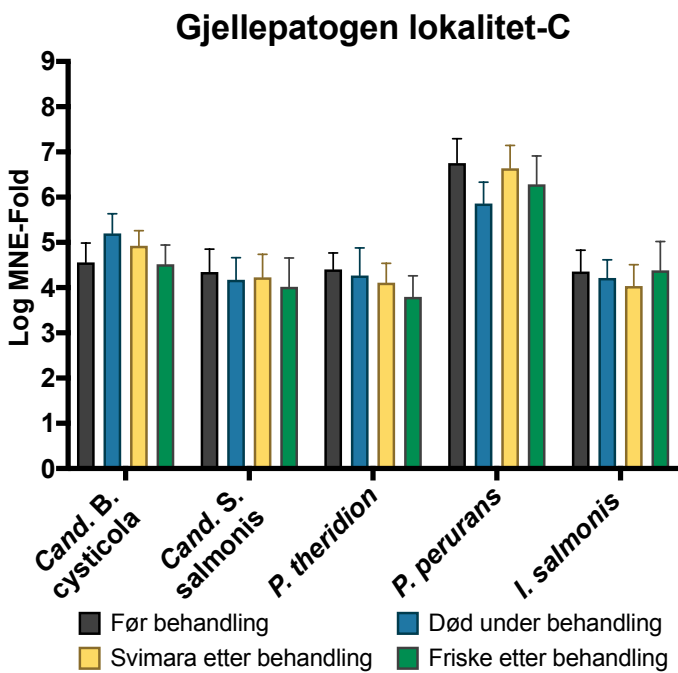
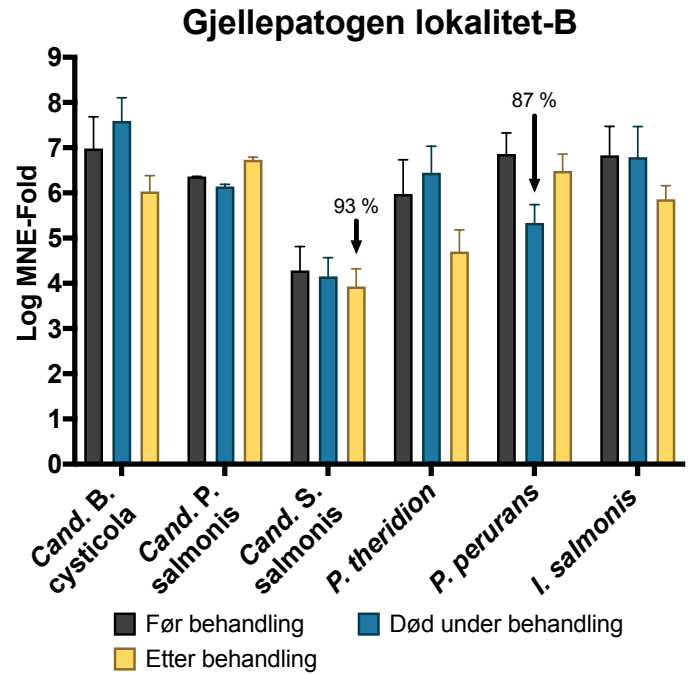
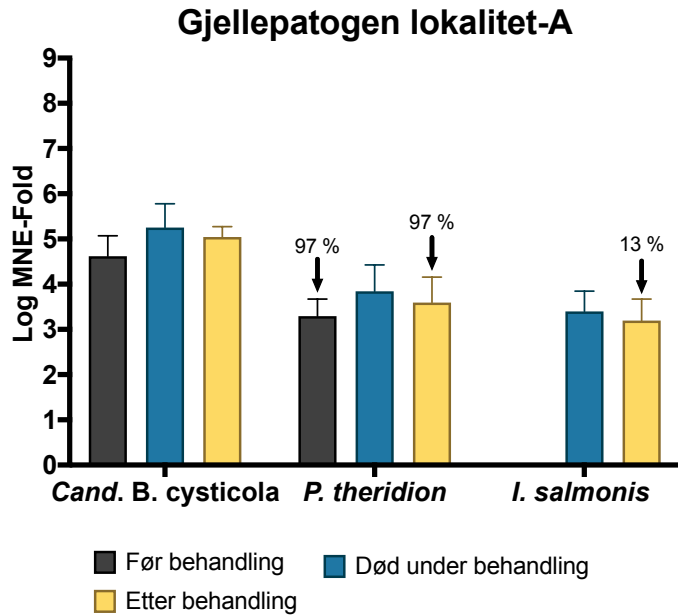
Det har ved fleire tidlegare høve vorte forsøkt å lage ein standard histologisk gjellescore for kartlegging av gjellehelsa til oppdrettslaks (Gjessing et al., 2018, Mitchell et al., 2012), dette var og eit av måla for dette prosjektet (AP: IV, Alf S. Dalum). Dessverre vart det ikkje nok tid til å nytte dette nye scoringssystemet i denne masteroppgåva, og ein forenkla versjon vart nytta. Det er vanskeleg å lage eit standard gjellescoringsystem då det alltid vil vere subjektivt, og histologiske undersøkingar vanlegvis berre tek for seg ein bit av ein gjelleboge, noko som utgjer ein liten del av det totale gjellevevet til ein fisk. For å avgrense arbeidsmengda i denne masteroppgåva var fem primærlameller per snitt undersøkt og scora. Dette utgjev ein liten prosentdel av det totale gjellevevet per fisk, og ein kan dermed rekne med å få ein annan score dersom andre scorar dei same snitta på andre primærlameller. Scoringssystemet vert derfor nytta som ein indikator på gjellehelsa til laksen. Sidan same person scora alle snitta, og innan eit kort tidsrom, kan ein nytte scoren til å studere utvikling av gjellescore før og etter behandling. Nokre av snitta hadde områder med autolyse, truleg som følge av for lang tid frå fisken vart avliva med ein overdose bedøvelsesmiddel og prøvetaking. I snitta med autolyse vart områder, tilsvarande fem primærlameller, utan autolyse scora. For å få ein meir korrekt gjellescore kunne snitta vorte scora blindt, men grunna praktisk gjennomføring og tidsavgrensing vart ikkje dette gjort.

## 4.2 Mikroparasittar

Patogenbelastinga på gjellene var ulike på dei tre lokalitetane i kommersiell produksjon, før termisk avlusing. Diversitetsindeksen var høgast ved lokalitet-B. Dette samsvarar med at patogenbelastinga i sjøen ofte er høgast tidleg på hausten når vassstemperaturen er høg (Gunnarsson et al., 2017, Herrero et al., 2018, Sveen et al., 2012). På vinteren og på våren er vassstemperaturen og patogenbelastinga i sjøen normalt lågare. Det samsvarar med at diversitetsindeksen var lågare ved avlusing i starten av desember (lokalitet-C), der det i tillegg var regnbogeaure som vart undersøkt, og på våren (lokalitet-A). Patogenbelastinga kan og ha samband med tida fisken har stått i sjøen før prøveuttaka i samband med dette studiet. Fisken frå lokaliteten med høgast diversitetsindeks hadde stått omlag eit år i sjøen, medan fisken frå dei to andre lokalitetane hadde stått omlag eit halvt år. Fisken som døydde under behandlinga hadde noko høgare diversitetsindeks samanlikna med fisken før og etter behandling.

### 4.2.1 Gjellepatogen

Ei rekkje patogen assosiert med gjellesjukdom (GD) (*Candidatus Branchiomonas cysticola*, *Candidatus Pisciclamydia salmonis*, *Candidatus Syngnamydia salmonis*, *Paranucleospora theridion*, *Ichthyobodo salmonis*, *Paramoeba perurans*) vart påvist med høg prevalens ved alle tre lokalitetane (Isaksen et al., 2011, Nylund et al., 2010, Nylund et al., 2011, Draghi et al., 2004, Mitchell et al., 2013, Nylund et al., 2014, Steinum et al., 2010, Young et al., 2007). Det var påvist fleire gjellepatogen på lokalitetane som vart behandla på hausten og tidleg vinter (lokalitet-B og -C), samanlikna med lokaliteten som vart behandla på våren (lokalitet-A) (figur 4.1). Dette samsvarar med at GD gjerne oppstår på denne tida av året (Gunnarsson et al., 2017, Steinum et al., 2010), og at fisken på lokalitet-B tidlegare hadde fått diagnosen gjellebetennelse og fisk på lokalitet-C diagnosen gjelleblødning. Årsaka til diagnosen gjelleblødning er ukjent, og fleire patogen kan truleg spele ei rolle. I hovudsak vart det registrert lite makroskopiske endringar i gjellevevet ved undersøking av all fisk frå kommersiell produksjon. Lokaliteten som vart behandla på hausten hadde derimot enkelt fisk med bleike gjeller. Sidan denne fisken hadde flest påviste gjellepatogen, i tillegg til å ha stått lengst i sjø, er det naturleg å registrere meir makroskopiske endringar på gjellene hos denne fisken.



**Figur 4.1.** Densitet til påviste gjellepatogen frå dei tre lokalitetane i kommersiell produksjon. Analyserte gjelleprøvar frå tre uttak for kvar lokalitet: før termiske behandling, fisken som døydde under behandlinga og etter behandling. Ved lokalitet-C var det tillegg eit fjerde uttak av svimara etter behandling. Data er presentert som Log MNE-Fold av positive prøvar og feilfeltet syner standardavviket (SD) mellom prøvane. Uttaka med prevalens under 100 % er vist med pil og prevalens i figuren. N= 30 for alle uttaka, med unntak av etter behandling på lokalitet-C der N= 13 for svimara og N= 12 for tilsynelatande friske fiskar.

*P. theridion* har ved tidlegare påvisingar vist sesongvariasjonar, med høg densitet om sommaren og hausten før densiteten søkk til relativt låge nivå om vinteren og våren (Gunnarsson et al., 2017, Sveen et al., 2012). Det samsvarar med resultatane frå dei tre anlegga i dette studiet. *P. theridion* vart påvist i gjeller på alle tre lokalitetane med ein prevalens  $\geq 97\%$  ved alle uttaka. Dette støttar Gunnarsson et al. (2017) sine funn om høgt smittepress av mikrosporidien på Vestlandet. MNE-Fold viser tendens til høgast densitet hos dødfisken både ved analyse av gjelle- og nyrevev. Tidlegare funn av mikrosporidien har vist relativ lik densitet

i alle positive organ (Nylund et al., 2010), som samsvarar med funn frå lokalitet-B. I tillegg krev mikrosporidien temperaturar over 10 °C for å utvikle seg til ein systemisk infeksjon i atlantisk laks (Gunnarsson et al., 2017, Sveen et al., 2012). Dette vart berre registrert ved lokaliteten som vart behandla på hausten (14,1 °C), og er truleg grunnen til mindre mikrosporidie i nyre ved lokalitet-C (Sveen et al., 2012). Lokaliteten som vart behandla på våren hadde derimot lik gjennomsnittleg Ct-verdi både i gjelle og nyre, men Ct-verdiane indikerer lite *P. theridion* (A. Nylund pers. kom.). Kva rolle parasitten spelar åleine er uklar, men saman med andre patogen har den vorte påvist å forårsake hyperplasi, hypertrofi og inflammasjon i gjellevev og ein kan derfor ikkje utelukke at den svekker gjellene (Nylund et al., 2011, Steinum et al., 2010, Sveen et al., 2012, Gunnarsson et al., 2017). I dette studiet vart den derimot registrert med høge gjennomsnittlege Ct-verdiar ved alle uttaka, sjølv om prevelensen var høg. Lågaste Ct-verdiar vart påvist hos dødfisken frå lokalitet-B ( $\geq 14,3$ ).

*Cand. B. cysticola*, som har vorte vist å vere primærpatogen for epiteliocystis (Toenshoff et al., 2012), vart påvist med ein prevalens på 100 % i gjeller ved alle uttaka og med signifikant høgast densitet hos dødfisken frå alle tre lokalitetane. Gunnarsson et al. (2017) såg at bakterien viste tendensar til høgare densitet sommar-haust, i dette studiet var densiteten relativ lik ved alle uttaka med gjennomsnittlege Ct-verdiar mellom 18,3-23,6. Ved epiteliocystis vert gjerne endringar i gjellevev som hyperplasi og hypertrofi av epitelceller og auka slimcelleproduksjon med påfølgjande respiratoriske problem observert (Nylund et al., 1998). I likskap med tidlegare studiar vart bakterien og påvist i nyre, som indikerer ein systemisk infeksjon (Tolås, 2012). Tolås (2012) registrerte positive nyreprøvar utan positive gjelleprøvar som kan indikere at bakterien har ein annan inngangsport enn gjellene. Dette vart ikkje registrert ved dette forsøket, der alle nyreprøvane hadde ein høgare Ct-verdiar samanlikna med tilsvarande gjelleprøve. Ved analyse av nyre for *Cand. B. cysticola* skilte dødfisken seg derimot ut med høgast prevalens ( $\geq 97$  %) ved alle tre lokalitetane. Gjennomsnittlege Ct-verdiar var derimot over 30,8 og indikerer lite bakterie i nyrene.

*I. salmonis* vart òg påvist på alle tre lokalitetane, med 100 % prevalens på lokalitet-B og -C og 100 % prevalens hos dødfisken på lokalitet-A. Parasitten har tidlegare vorte påvist saman med andre patogen i samband med gjellesjukdom (Gunnarsson et al., 2017, Nylund et al., 2011). Med unntak av lokalitet-A skilte ikkje dødfisken seg ut med høgast densitet, og det er ingen indikasjonar på at denne parasitten gjer fisken dårlegare rusta til ein termisk behandling eller at termiske behandling fører til proliferasjon av *I. salmonis*.

Dei to lokalitetane som vart behandla på haust og vinter (lokalitet-B og -C) hadde i tillegg *Cand. S. salmonis* og *P. perurans* med prevalens over 87 % ved alle uttaka. Lokalitet-B hadde i tillegg

*Cand. P. salmonis* med ein prevalens på 100 %. *Cand. S. salmonis* og *Cand. P. salmonis* er begge chlamydia-bakteriar som har vorte assosiert med epiteliocystis (Draghi et al., 2004, Nylund et al., 2014). Kva samanheng *Cand. P. salmonis* har med epiteliocystar har derimot vore diskutert i seinare tid, då det har vorte gjennomført studiar som viser ein høgare prevalens av epiteliocystar enn prevalens av bakterien (Mitchell et al., 2013, Steinum et al., 2010, Toenshoff et al., 2012). Det vart påvist signifikant høgast densitet hos fisken etter behandlinga, ein kan derfor anta at bakterien ikkje har spelt ei rolle i dødelegheita. *Cand. S. salmonis* er ein nyleg karakterisert bakterie, og kunnskapen om denne er derfor avgrensa (Nylund et al., 2014). Bakterien har derimot vorte isolert frå fisk med *P. perurans* og synest å vere ein endosymbiont i amøben med evne til å vokse og overleve (Nylund et al., 2018b). Både amøben og bakterien vart påvist på to av lokalitetane med høg prevalens og Ct-verdiar som syner ein samanheng i mengda mellom desse to. Både bakterien og amøben vart derimot påvist i enkelt fisk der den andre var negativ. Dette støttar Nylund et al. (2018b) sine funn om at bakterien ikkje er ein obligat symbiont for amøben.

*P. perurans* vart påvist med ein prevalens på 100 % i gjellene på lokalitet-B og -C, med unntak av dødfisken på lokalitet-B der prevalensen var 87 %. Amøben forårsakar amøbegjellesjukdom (AGD), som ofte vert påvist på hausten i norsk lakseoppdrett og forsvinn gjennom vinteren (Karlsbakk, 2015). Dette samsvarar med resultatata i dette studiet der fisken på lokalitet-A (vår) var negativ for amøben. Densiteten ved begge dei to positive lokalitetane syner mindre amøbe hos fisken som døyde under behandlinga, som indikerer at amøben ikkje var ein årsak til dødelegheit og kan tyde på at amøben forlét den døde fisken. Det vart heller ikkje registrert makroskopiske lesjonar på gjellene som samsvarar med AGD, og fisk med låg AGD-score er mindre utsett for å døy av ei handtering (Taylor et al., 2009).

Ingen av dei påviste gjellepatoga skil seg ut med spesielt høg densitet. Generelt vart det påvist gjellepatogen med høg prevalens og låg til moderat densitet. Ein har lite kunnskap om kva påverking dei ulike gjellepatogena har åleine. Summen av fleire gjellepatogen kan derimot truleg svekke fisken, og gjere den dårlegare rusta for ei handtering og stressande situasjonar.

## 4.2.2 Andre patogen

Fisken frå dei tre lokalitetane var og positiv for virusa *PRV*, *PMCV* og *SAV*, som i hovudsak ikkje infiserer gjeller. *PRV* som har vorte vist å forårsake hjarte- og skjellettmuskelbetennelse (HSMB) (Kongtorp et al., 2004, Palacios et al., 2010, Vendramin et al., 2019), vart påvist på lokalitet-A og -B med ein prevalens på 100 % ved alle tre uttaka. Viruset, som er svært utbreidd blant atlantisk laks i sjøfasen, infiserer erytrocyttar og forårsakar inflammasjon i hjarte- og skjellettmuskulatur (Løvoll et al., 2012, Finstad et al., 2014, Kongtorp et al., 2004, Dharmotharan et al., 2020). Truleg vart viruset påvist i gjellevev grunna infeksjon i sirkulerande erytrocyttar og ein kronisk form av infeksjon (Dharmotharan et al., 2020). Påvising av låge Ct-verdiar av *PRV* har vore observert i samband med utbrot av HSMB, men høge Ct-verdiar kan og førekome utan diagnosen HSMB (Løvoll et al., 2012). Ingen av lokalitetane hadde påvist HSMB og viruset var i hovudsak påvist med høge Ct-verdiar, som indikerer lite måltemplat og dermed lite virus i prøven. Sidan viruset påverkar hjarte, kan det likevel tenkjast at fisken kan ha vore svekka og dermed tolt ei handtering dårlegare.

*PMCV* forårsakar kardiomyopatisyndrom (CMS) som er eit auka problem i norsk lakseoppdrett og den viktigaste årsaken til dødelegheit blant laks i sjø (Haugland et al., 2011, Sommerset et al., 2020). Sjukdommen vert ofte omtala som hjartesprikk, dette fordi viruset forårsakar betennelsesreaksjonar i den spongiose delen av atriet og ventrikkelen, som i alvorlege tilfelle kan vere så omfattande at atriet sprikk (Ferguson et al., 1990). Dette gjer hjarta skjørt og dårleg rusta for stress og handtering. Viruset vart påvist på lokalitet-A og -B, men på lokalitet-A var prevalensen svært låg ( $\leq 10\%$ ) og Ct-verdiane svært høge ( $\geq 35,9$ ). Fisken frå lokalitet-B hadde derimot høgare prevalens ved alle tre uttaka ( $\geq 70\%$ ), i tillegg til at denne fisken tidlegare hadde fått diagnosen CMS. Dette i tillegg til at det var observert koagulert blod i pericardialhola hos mange av dødfiskane, kan tyde på at positive individ var svekka av viruset og dermed ikkje tolte behandlinga.

*SAV* vart berre påvist i regnbogeauren frå lokalitet-C. I Noreg finst det to subtypar av *SAV* som begge forårsakar pankreasjukdom (PD) hos atlantisk laks og regnbogeaure i oppdrett (Hjortaas et al., 2013, Jansen et al., 2014, Weston et al., 2002, Karlsen et al., 2014); *SAV3* som lenge har vore kjent i norsk oppdrett og *SAV2* som fyrst var påvist i Noreg i 2011 (Hjortaas et al., 2013). Assayet som vart nytta for påvising detekterer begge subtypane av viruset, men sidan dei i hovudsak vert påvist i kvar sine geografiske område, *SAV3* på Vestlandet og *SAV2* i Midt-Noreg (Hjortaas et al., 2013, Jansen et al., 2014), antar ein at det var *SAV3* som vart påvist her. PD er ein av dei mest alvorlege virussjukdommane i norsk lakseoppdrett, og forårsakar

store økonomiske tap med dødelegheit mellom 3-20 % (Taksdal et al., 2007). Utbrot av sjukdommen kan førekome heile året, men dei fleste tilfella oppstår gjerne i sommarhalvåret med høge vass temperaturar (McVicar, 1987). Sjukdommen omfattar skadar i pankreas og betennelse og nekrose i hjarte- og skjelettmuskulatur (McLoughlin et al., 2002). Utbrot og omfang av PD vert påverka av faktorar som stressar fisken, som til dømes andre sjukdommar, handtering og miljø (McVicar, 1987). Statistiske analysar viste at densiteten var signifikant høgast hos dødfisken, noko som kan tyde på at fisk med høg densitet av viruset toler stress i samband med behandling dårlegare og dermed døydde. Regnbogearen på lokaliteten hadde i tillegg diagnosen PD, og hjarta kan dermed ha vore svekka som følgje av sjukdommen.

I regnbogearen frå lokalitet-C vart det òg påvist ein mindre kjent og lite omtala parasitt, som er slektning til ei gruppe parasittar på andre fisk (X-celle-liknande parasitt) (Nylund et al., 2006, A. Nylund, pers. kom.) Denne parasitten har vorte påvist frå sjuk regnbogeare tidlegare, med kvite granulom i ei rekkje organ. Parasitten vart berre påvist hos den fisken som døydde eller svima etter behandlinga, sjølv om densiteten i hovudsak var låg. Det er derfor interessant å studere denne vidare, for å finne ut kva påverknad den har på fisken.

Ved smitteforsøket vart berre fisken ved siste uttak (7 dagar etter behandling) analysert for patogen, for å kartleggje om den atlantiske laksen nytta i forsøket var patogenfri. Fisken var positiv for *Tenacibaculum* spp., med høgast prevalens i kar 4-6 (80, 100 og 100 %). TB-tuf assayet som vart nytta, har ein låg spesifisitet og kan detektera fleire artar *Tenacibaculum*, blant anna *T. finnmarkense*, *T. dicentrarchi*, *T. ovolticum* og *T. soleae* (Småge et al., 2018). I tillegg har fleire artar av *T. finnmarkense* vist seg å ikkje vere patogene for laks (Olsen et al., 2017, Olsen et al., 2011, Småge et al., 2018). Det er kjent at ILAB har ein variant av *Tenacibaculum* spp. i vatnet (A. Nylund, pers. kom.). Dette i tillegg til høge Ct-verdiar, gjer at fisken vert rekna som patogenfri.

### 4.3 Histopatologiske undersøkingar

Den histologiske gjellescoringa viste ingen utvikling av gjellescore etter behandling, verken ved smitteforsøket eller i kommersiell produksjon. Dette samsvarar med diversitetsindeksen som heller ikkje vart endra etter behandling. Det var heller ikkje noko stor utvikling av enkelte akutte skadar, som ein kan forvente å finne etter ei handtering som er stressande for fisken (Pope et al., 2018, Gismervik et al., 2019, Ferguson, 1989). Lokalitet-A fekk færre registrerte patologiske endringar og lågare gjellescore, samanlikna med dei to andre lokalitetane. Dette samsvarar med diversitetsindeksen og at lokalitet-B og -C hadde påvist gjellesjukdom.

I tre snitt etter behandling frå lokalitet-A vart det observert epiteliocystar, som kan forårsakast av bakterien *Cand. B. cysticola* (Mitchell et al., 2013, Toenshoff et al., 2012, Nylund et al., 1998), som vart påvist frå denne fisken. Truleg har bakterien liten påverking på gjellehelse hos denne fisken, då det vart observert få fisk med epiteliocystar og ingen patologiske endringar rundt cystene (Mitchell et al., 2013). *Cand. B. cysticola* er funne å tilhøyra den normale bakteriefloraen i gjellevev hos atlantisk laks, der positiv fisk ikkje hadde endringar i gjellevevet (Mitchell et al., 2013, Toenshoff et al., 2012, Tolås, 2012). Det vert støtta av dette studiet der det var registrert Ct-verdiar ned mot 17,7 utan endring i gjellevevet ved histologisk undersøking. I hovudsak var det få og mindre alvorlege endringar som vart registrert på fisken frå lokalitet-A, og basert på den histologiske gjellescore saman med låg mengde gjellepatogen vart gjellehelsa til denne fisken vurdert som god både før og etter behandling med Thermolicer. Fisk frå lokalitet-B og -C viste noko meir patologiske endringar i gjellevevet samanlikna med lokalitet-A. Begge desse lokalitetane hadde kvar si gjellediagnose høvesvis gjellebetennelse og gjelleblødning, som begge er uspesifikke diagnosar der fleire patogen kan vere involvert (Gunnarsson et al., 2017, Herrero et al., 2018, Steinum et al., 2010). Frå real-time RT-PCR-analysar samsvarar dette med at begge lokalitetane fekk påvist fleire gjellepatogen med høg prevalens. Hovudfunna ved både uttaka før og etter behandling ved desse to lokalitetane, syner områder med samanvokste sekundærlameller som følge av hyperplasi og hypertrofi av epitelceller, i tillegg til inflammasjon og slimcellehyperplasi. Dette er vanlege funn hos fisk med gjellesjukdommar (Mitchell et al., 2012, Nylund et al., 1998, Nylund et al., 2011, Steinum et al., 2010, Gjessing et al., 2018). Fisken frå lokalitet-B hadde i tillegg eldre aneurismar i hovuddelen av undersøkt fisk, som tyder på tidlegare skadar i gjellevevet. Tilnærma likt antall ferske aneurismar før og etter behandling, tyder på at andre faktorar har spelt inn. Regnbogearen frå lokalitet-C viste motsett tendens med fleire ferske aneurismar enn eldre, som samsvarar med diagnosen gjelleblødning. Det var derimot tilnærma lik mengde ferske



aneurismer hos fisken både før og etter behandling. Sjølv om både den atlantiske laksen og regnbogearen frå desse to lokalitetane synte meir patologiske endringar i gjellevevet samanlikna med den atlantiske laksen frå lokalitet-A, er det lite som tyder på at gjellehelsa vart svekka av den termiske behandling. Gjellehelsa kan derimot ha vore svekka før behandlinga grunna fleire gjellepatogen og patologiske endringar i gjellevevet, og dermed gjort fisken mindre robust for å takle ei handtering i form av termiske behandling.

Det vart observert lite patogen på histologisnitt, sjølv om fleire patogen som *I. salmonis* og *P. perurans* vart påvist ved real-time RT-PCR. Mogeleg forklaring på dette kan vere at patogena vart vaska vekk ved metoden som vart nytta til prosessering av vevsnitta (A. Nylund, pers. kom.).

Ved smitteforsøket vart det observert chalimus apikalt på primærlameller hos sju fisk før behandling og ein fisk ein dag etter behandling, ved histologiske undersøkingar. Det vart ikkje talt lus frå gjellene makroskopisk, men erfaringsmessig er det få lus som festar seg på gjellene (S. Blindheim, pers. kom). Grunna variasjonar i utviklingstid for lakselus vart det rundt behandlingstidspunktet registrert chalimus festa på gjellene (Hamre et al., 2019). Ved det tredje uttaket (7 dagar etter behandling) har truleg all lusa utvikla seg til pre-adulte stadier, og ein vil derfor ikkje finne lus på gjellene. Apikalt på primærlamellene, rundt festepunktet til lusa, vart det observert proliferasjon av epitelceller og inflammasjon. Utanom dette var det lite patologisk endring ved alle tre uttaka, og gjellehelsa vart vurdert som god og uendra.

## 4.4 Dødelegheit i samband med behandlingane

Ved å studere data frå norsk oppdrettsnæring frå 2012-2017 viste Overton et al. (2019) at behandling mot lakselus fører til ein auke i dødelegheit i månaden etter behandling, samanlikna med månaden før. Denne auken var størst ved bruk av termiske metodar, samanlikna med andre avlusingsmetodar. I dette studiet vart det òg registrert ein auke i dødelegheit i månaden etter behandling, men samanlikna med dødelegheita i månaden før behandling var det ingen kraftig auke. Lokaliteten som hadde lågast diversitetsindeks og færrest patologiske endringar i gjellevevet, hadde og lågast dødelegheit i månaden før behandling (lokalitet-A). Ved denne lokaliteten auka dødelegheita frå 0,2 % i månaden før behandling til 0,6 % i månaden etter behandling. Samanlikna med lokaliteten med høgast diversitetsindeks og fleire endringar i gjellevevet (lokalitet-B), er det ein tydeleg høgare dødelegheit på denne lokaliteten.

Dødelegheita auka frå 2,2 % i månaden før behandling til 3,7 % i månaden etter behandling. Det kan tyde på at mengda patogen spelar ei rolle i korleis laksen tolerer ein termisk behandling. I tillegg hadde denne fisken gjennomgått fire tidlegare behandlingar mot lakselus innan ein periode på seks månadar. Ein har sett at laks som vert utsett for stress over lengre periodar er vist å få redusert immunrespons, og er truleg meir mottakeleg for enkelte patogen (Fast et al., 2008, Wiik et al., 1989).

Ved avlusinga på lokalitet-C var det forhøga dødelegheit i samband med behandlinga. Det er derimot vanskeleg å vurdere den mot dødelegheita i forkant, då lokaliteten ikkje ville oppgjje data på dette. Dødelegheita under behandlinga var derimot rapportert å skuldast ein feil under trenginga og pumpinga på veg inn i Optiliceren, og ikkje av behandlinga i seg sjølv. Utifrå diversitetsindeks og histologisk gjellescore samanlikna med dei to andre lokalitetane, er det ingenting som tyder på at dødelegheita skulle vore høgare enn ved lokalitet-B, som hadde høgare diversitetsindeks og histologisk gjellescore. I tillegg vart det registrert ein del kjønnsmodne hannar før behandlinga, og desse vil truleg tole ei behandling dårlegare samanlikna med resten av fisken (Taranger et al., 2010b). Det vart og registrert raude parti i hovudregionen til ein del svimara etter behandling, som kan tyde på slagskadar under den mekaniske delen av behandlinga.

Under smitteforsøket var det noko dødelegheit gjennom heile forsøket. I perioden mellom smitte med copepodittar og behandlinga døyde tre fisk, alle frå usmitta kar. Det var ingen dødelegheit på behandlingsdagen eller i dei to påfølgjande dagane. Frå tre dagar etter behandlinga og fram til forsøket vart avslutta, døyde to fiskar og tre svimara vart avliva. Dødelegheita som vart registrert i forsøket i samband med erosjonen på underkjeven som vart registrert ved alle uttaka, uavhengig om fisken var behandla eller ikkje, er vanleg å sjå ved forsøk med fullt sjøvatn på ILAB (A. Nylund, pers. kom.). Truleg er dette forårsaka av ein *Vibrio splendidus*-liknande bakterie, som er etablert på ILAB. Dette i tillegg til at det døyde to fiskar frå kontrollkaret (kar-1), og henholdsvis to og tre fiskar frå dei smitta og behandla kara (kar-5 og kar-6), tyder på at behandling åleine ikkje forårsaka dødelegheit.

## 4.5 Smerte ved eksponering for varmt vatn

Det har vorte stilt spørsmål ved smerteopplevinga til laksen ved bruk av termiske metodar til behandling mot lakselus (Poppe et al., 2018). Nilsson et al. (2019) utførte eit forsøk for å kartleggje åtferda til laks ved eksponering for varmt vatn, som viste at ved 28 °C døydde hovuddelen av fisken etter omlag fire minutt. Ved 34 °C, som samsvarar med temperaturar nytta i dette studiet, døydde fisken etter omlag to minutt i varmt vatn. Ved låge og middels temperaturar roa fisken seg ned innan 30 sek, over 28 °C gjorde ikkje fisken dette. I tillegg kolliderte fisken i karveggen og søkte mot vassoverflata før den slutta å røre seg og døydde. Desse responsane skjedde tidlegare ved høgare temperaturar. Det vart konkludert med at temperaturar over 28 °C er ubehageleg for fisken, og den viser smerterespons innan få sekund. Auka aktivitetsnivå vart og observert i dette forsøket, men ikkje før etter 10 sek. Det kan truleg ha samband med at fisken var sedert og dermed hadde ein seinare reaksjon (Adams, 2019). Kollisjonar eller annan aktivitet observert av Nilsson et al. (2019) vart ikkje observert her, då fisken vart halden i håv og ein dermed berre kunne registrere kraftig sprelling. Kort tid etter behandling roa fisken seg derimot ned, og basert på synleg patologi og histopatologiske undersøkingar av gjellevev er det lite som tyder på at fisken fekk vedvarande skadar av behandling. Sedasjonen i dette forsøket kan derimot ha hatt ein positiv effekt på fisken i etterkant, då studiar har vist at sedert fisk raskare går tilbake til normal symjeaktivitet etter overføring til normale forhold (Adams, 2019). I tillegg til at sedert fisk viser mindre kraftig reaksjon på varmt vatn og responsen er forsinka.

Gismervik et al. (2019) fann akutte vevskadar i ei rekkje organ hos atlantisk laks ved utsetjing for vass temperaturar over 34 °C i 72 til 140 sekund. Tilsvarande funn har og vorte registrert frå fisk i kommersiell produksjon i etterkant av termisk avlusing (Poppe et al., 2018). Med unntak av erosjon i kjevepartiet som utvikla seg gjennom forsøket, og var tilsvarande likt i alle kara, vart det ikkje registrert makroskopiske skadar på fisken. Etter behandlinga vart det registrert svarte snutar på hovuddelen av den undersøkte behandla fisken, men desse forsvann og er truleg ikkje av betydning. Gjellevev var det einaste som vart undersøkt histologisk her, og kan derfor ikkje utelukke skadar i andre vev. Hjernen vart blant anna ikkje sjekka, og blødning i hjernen har vorte observert både i forsøk med varmt vatn og i felt i samband med termisk avlusing (Gismervik et al., 2019, Poppe et al., 2018). Gismervik et al. (2019) registrerte blødning i hjernen, både makroskopisk og histologisk hos ei rekkje individ etter eksponering for varmt vatn. Dette vart i hovudsak registrert i fisk eksponert for høgare temperaturar og lengre holdetid. Ved 34 °C vart det berre registrert histologisk i ein fisk, eksponert i 90-140 sekund.

## 5 Konklusjon og vidare arbeid

Dette studiet har vist at verken patogenbelastninga i gjellevev eller histopatologiske endringar i gjellevevet, vert endra etter ein termisk avlusing av atlantisk laks eller regnbogeare. Det kan derimot visast at fisken som døydde av behandling har noko høgare densitet av enkelte patogen. Dødelegheita i samband med termiske avlusingar syner å ha samband med patogenbelastninga, dødelegheit og status på gjellehelsa i forkant av behandlinga. Gjellehelsa syner ikkje å verta påverka negativt av behandling med varmt vatn i ettertid, men dårleg gjellehelse før behandling kan truleg føre til ein forhøga dødelegheit. I tillegg syner kjente virussjukdommar å ha påverking på dødelegheita. Det er derimot ein føresetnad at fisken vert handtert skånsamt under trenginga og pumpinga i forkant av behandlinga. Studiet viser òg at termisk avlusing har ein god effekt på reduksjon av mobile lakselus.

Vidare studiar bør studere fisken nærare gjennom heile behandlinga for å finne forbetringpunkt på avlusingskonstruksjonane. I tillegg bør ein fokusere på å auka kunnskap rundt dei enkelte gjellepatogena, for å kartleggje kva effekt dei har åleine. Dette vil gjere det enklare for fiskehelsepersonell å vurdere risikoen med ein termisk avlusing, og bidra til betre utfall. Dette studiet fokuserte på gjellene til laksen, det vil sjølvsagt og vere interessant å studere hud og andre organ som er i nærkontakt med det oppvarma vatnet. Hjernen vart heller ikkje undersøkt her, og det ville vore interessant å studere prevalensen av hjerneblødning i etterkant av termisk avlusing for å sjå om det er det varme vatnet eller slagskadar i samband med pumpinga som forårsakar dette. I dette studiet vart fisken frå lokalitetane følgt til omlag ei veke etter behandling. Det kunne vore interessant å følgje dei lenger, for å studere om belastninga av dei ulike patogena byggjer seg opp over tid.

## 6 Referansar

- Forskrift om lakselusbekjempelse. Forskrift 1. desember 2012 om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg. *FOR-2012-12-05-1140*.
- ABOLOFIA, J., ASCHE, F. & WILEN, J. E. 2017. The Cost of Lice: Quantifying the Impacts of Parasitic Sea Lice on Farmed Salmon. *Marine Resource Economics*, 32, 329-349.
- ADAMS, M. 2019. Performance of Atlantic salmon following simulated thermal delousing with AQUI-S® sedation. Institute for marine & antarctic studies
- BRON, J. E., SOMMERVILLE, C., JONES, M. & RAE, G. H. 1991. The settlement and attachment of early stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) on the salmon host, *Salmo salar*. *Journal of Zoology*, 224, 201-212.
- BROOKER, A. J., PAPADOPOULOU, A., GUTIERREZ, C., REY, S., DAVIE, A. & MIGAUD, H. 2018. Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. BMJ Publishing Group Limited.
- COSTELLO, M. J. 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22, 475-483.
- COSTELLO, M. J. 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*, 32, 115-118.
- CULLING, C. F. A., ALLISON, R. T. & BARR, W. T. 1985. *8 - Haematoxylin and its counterstains*, Elsevier Ltd.
- DHAMOTHARAN, K., BJØRGEN, H., MALIK, M. S., NYMAN, I. B., MARKUSSEN, T., DAHLE, M. K., KOPPANG, E. O., WESSEL, Ø. & RIMSTAD, E. 2020. Dissemination of Piscine orthoreovirus-1 (PRV-1) in Atlantic Salmon ( *Salmo salar* ) during the Early and Regenerating Phases of Infection. *Pathogens*, 9.
- DRAGHI, A., II, POPOV, V. L., KAHL, M. M., STANTON, J. B., BROWN, C. C., TSONGALIS, G. J., WEST, A. B. & FRASCA, S., JR. 2004. Characterization of "Candidatus *Piscichlamydia salmonis*" (Order Chlamydiales), a Chlamydia-Like Bacterium Associated With Epitheliocystis in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5286.
- DUESUND, H., NYLUND, S., WATANABE, K., OTTEM, K. F. & NYLUND, A. 2010. Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) at a marine site on the west coast of Norway. *Virology Journal*, 7, 19-19.

- 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 and Shellfish Immunology*, 24, 194-204.
- FERGUSON, H., POPPE, T. & SPEARE, D. 1990. Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 8, 225-231.
- FERGUSON, H. W. 1989. *Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*, Iowa State University Press.
- FINSTAD, Ø. W., DAHLE, M. K., LINDHOLM, T. H., NYMAN, I. B., LØVOLL, M., WALLACE, C., OLSEN, C. M., STORSET, A. K. & RIMSTAD, E. 2014. Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Veterinary Research*, 45, 35-35.
- FRISCH, K., SMÅGE, S. B., JOHANSEN, R., DUESUND, H., BREVIK, Ø. J., NYLUND, A. & BOUDINOT, P. 2018. Pathology of experimentally induced mouthrot caused by *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon smolts. *PLoS ONE*, 13.
- GAMBLE, M. & BANCROFT, J. D. 2008. *Theory and practice of histological techniques*, Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier.
- 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.
- GJESSING, M. C., AAMELFOT, M., BATTS, W. N., BENESTAD, S. L., DALE, O. B., THOEN, E., WELI, S. C. & WINTON, J. R. 2018. Development and characterization of two cell lines from gills of Atlantic salmon.(Research Article). *PLoS ONE*, 13, e0191792.
- GRIMNES, A. & JAKOBSEN, P. J. 1996. The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon*, 1179-1194.
- GRØNTVEDT, R. N., NERBØVIK, I. K. N., VILJUGREIN, H., LILLEHAUG, A., NILSEN, H. & GJEVRE, A. G. 2015. Termisk avlusning av laksefisk - dokumentasjon av fiskevelferd og effekt. *Veterinærinstituttets rapportserie*
- 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.
- HAMRE, L., EICHNER, C., DALVIN, S., BRON, J., NILSEN, F., BOXSHALL, G. & SKERN-MAURITZEN, R. 2013. The Salmon Louse *Lepeophtheirus salmonis*

- (Copepoda: Caligidae) Life Cycle Has Only Two Chalimus Stages. *PLoS One*, 8, e73539.
- HAMRE, L., GLOVER, K. & NILSEN, F. 2009. Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer 1837)) laboratory strains. *Parasitol. Int.*, 58, 451-460.
- HAMRE, L. A., BUI, S., OPPEDAL, F., SKERN - MAURITZEN, R. & DALVIN, S. 2019. Development of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* parasitic stages in temperatures ranging from 3 to 24°C.
- HAUGLAND, Ø., MIKALSEN, A. B., NILSEN, P., LINDMO, K., THU, B. J., ELIASSEN, T. M., ROOS, N., RODE, M. & EVENSEN, Ø. 2011. Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the Totiviridae Family. *Journal of Virology*, 85, 5275-5286.
- HELGESEN, K. O. & HORSBERG, T. E. 2013. Single-dose field bioassay for sensitivity testing in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* : development of a rapid diagnostic tool. *Journal of Fish Diseases*, 36, 261-272.
- HELGESEN, K. O., HORSBERG, T. E. & TARPAL, A. 2020. The surveillance programme for resistance in salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in Norway 2019.
- HELLEBØ, A., STENE, A. & ASPEHAUG, V. 2017. PCR survey for *Paramoeba perurans* in fauna, environmental samples and fish associated with marine farming sites for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases*, 40, 661-670.
- HERRERO, A., THOMPSON, K. D., ASHBY, A., RODGER, H. D. & DAGLEISH, M. P. 2018. Complex Gill Disease: an Emerging Syndrome in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Comparative Pathology*, 163, 23-28.
- HEUCH, P. A. & KARLSEN, E. 1997. Detection of infrasonic water oscillations by copepodids of *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda Caligida). *Journal of Plankton Research*, 19, 735-747.
- HEUCH, P. A., NORDHAGEN, J. R. & SCHRAM, T. A. 2000. Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature. *Aquaculture Research*, 31, 805-814.
- HJELTNES, B., JENSEN, B. B., BORNØ, G., HAUKAAS, A. & WALDE, C. S. R. 2019. Fiskehelse rapporten 2018.
- HJORTAAS, M. J., SKJELSTAD, H. R., TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., JOHANSEN, R., BANG-JENSEN, B., ØRPETVEIT, I. & SINDRE, H. 2013. The first detections of subtype 2-related salmonid alphavirus (SAV2) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *Journal of fish diseases*, 36, 71.

- HODNELAND, K. & ENDRESEN, C. 2006. Sensitive and specific detection of Salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 131, 184-192.
- HØGSET, L. 2014. Resultat fra in vitro testing av lakselus's følsomhet for Aqui-S. scanvacc.com.
- IGBOELI, O. O., FAST, M. D., HEUMANN, J. & BURKA, J. F. 2012. Role of P-glycoprotein in emamectin benzoate (SLICE®) resistance in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *Role of P-glycoprotein in emamectin benzoate (SLICE®) resistance in sea lice, Lepeophtheirus salmonis*, 344, 40-47.
- ISAKSEN, T., KARLSBAKK, E., WATANABE, K. & NYLUND, A. 2011. *Ichthyobodo salmonis* sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida), an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Parasitology*, 138, 1164-75.
- ISAKSEN, T. E., KARLSBAKK, E., REPSTAD, O. & NYLUND, A. 2012. Molecular tools for the detection and identification of *Ichthyobodo* spp. (Kinetoplastida), important fish parasites. *Parasitology International*, 61, 675-683.
- JAKOB, E., BARKER, D. E. & GARVER, K. A. 2011. Vector potential of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in the transmission of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). *Diseases of aquatic organisms*, 97, 155.
- JANSEN, M. D., JENSEN, B. B. & BRUN, E. 2014. Clinical manifestations of pancreas disease outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus subtype. *Journal of Fish Diseases*, 38, 343-353.
- JOHNSON, S. C. & ALBRIGHT, L. J. 1991. The developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae). *Canadian Journal of Zoology*, 69, 929-950.
- JÓNSDÓTTIR, H., BRON, J. E., WOOTTEN, R. & TURNBULL, J. F. 1992. The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 15, 521-527.
- KARLSBAKK, E. 2015. Amøbisk gjellesykdom (AGD) - litt om den nye plagen. *Havforskningsrapporten 2015*, 33-35.
- KARLSEN, M., GJERSET, B., HANSEN, T. & RAMBAUT, A. 2014. Multiple introductions of salmonid alphavirus from a wild reservoir have caused independent and self-sustainable epizootics in aquaculture. *Journal of General Virology*, 95, 52-59.
- KARLSEN, M., NYLUND, A., WATANABE, K., HELVIK, J. V., NYLUND, S. & PLARRE, H. 2008. Characterization of 'Candidatus *Clavochlamydia salmonicola*': an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Characterization of 'Candidatus*



- Clavochlamydia salmonicola*: an intracellular bacterium infecting salmonid fish, 10, 208-218.
- KOMISARCZUK, A. Z., GROTMOL, S. & NILSEN, F. 2017. Ionotropic receptors signal host recognition in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda). *PLoS One*, 12.
- KONGTORP, R. T., TAKSDAL, T. & LYNGØY, A. 2004. Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms*, 59, 217.
- KRAGESTEEN, T. J., SIMONSEN, K., VISSER, A. W. & ANDERSEN, K. H. 2019. Optimal salmon lice treatment threshold and tragedy of the commons in salmon farm networks. *Aquaculture*, 734329.
- KRYVI, H. & POPPE, T. 2016. *Fiskeanatomi*, Bergen, Fagbokforl.
- KVELLESTAD, A., FALK, K., NYGAARD, S., FLESJA, K. & HOLM, J. 2005. Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV) infection contributes to proliferative gill inflammation (PGI) in seawater-reared *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, 67, 47-54.
- LØVOLL, M., ALARCÓN, M., BANG JENSEN, B., TAKSDAL, T., KRISTOFFERSEN, A. B. & TENGS, T. 2012. Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. *Diseases of aquatic organisms*, 99, 7.
- MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 137-151.
- MCLOUGHLIN, M. F., NELSON, R. N., MCCORMICK, J. I., ROWLEY, H. M. & BRYSON, D. B. 2002. Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 25, 33-43.
- MCVICAR, A. H. 1987. Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Scotland: Epidemiology and early pathology. *Aquaculture*, 67, 71-78.
- MITCHELL, S., BAXTER, E., HOLLAND, C. & RODGER, H. 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*). *Journal of the European Aquaculture Society*, 20, 813-825.
- MITCHELL, S. O. & RODGER, H. D. 2011. A review of infectious gill disease in marine salmonid fish.(Report). *Journal of Fish Diseases*, 34, 411.
- 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, 35.
- MUSTAFA, A., MACWILLIAMS, C., FERNANDEZ, N., MATCHETT, K., CONBOY, G. A. & BURKA, J. F. 2000. Effects of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Kröyer, 1837) infestation on macrophage functions in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 10, 47-59.
- NILSSON, J., MOLTUMYR, L., MADARO, A., KRISTIENSEN, 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.
- NYLUND, A., BJØRKNES, B. & WALLACE, C. 1991. *Lepeophtheirus salmonis* - A POSSIBLE VECTOR IN THE SPREAD OF DISEASES ON SALMONIDS. . *Bull.Eur.Ass. Fish Path*, 11 (6), 213-216.
- NYLUND, A., DEVOLD, M., PLARRE, H., ISDAL, E. & AARSETH, M. 2003. Emergence and maintenance of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Europe: a new hypothesis. *Diseases of aquatic organisms*, 56, 11.
- NYLUND, A., HANSEN, H., BREVIK, O. J., HUSTOFT, H., MARKUSSEN, T., PLARRE, H. & KARLSBAKK, E. 2018a. Infection dynamics and tissue tropism of *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxozoa: Myxosporidia) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). (Report). *Parasites & Vectors*, 11.
- NYLUND, A., KARLSBAKK, E., MYKLEBUST, C. & WATANABE, K. 2006. Ny parasitt påvist hos regnbueørret i oppdrett på Vestlandet. *Norsk Fiskeoppdrett*.
- NYLUND, A., KARLSBAKK, E., SAETHER, P., KOREN, C., LARSEN, T., NIELSEN, B., BROEDERUD, A., HOESTLUND, C., FJELLSOEY, K., LERVIK, K. & ROSNES, L. 2005. *Parvicapsula pseudobranchicola* (Myxosporidia) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: tissue distribution, diagnosis and phylogeny. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 197-204.
- NYLUND, A., KVENSETH, A. M. & ISDAL, E. 1998. A Morphological Study of the Epitheliocystis Agent in Farmed Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10, 43-55.
- NYLUND, A., PISTONE, D., TRÖSSE, C., BLINDHEIM, S., ANDERSEN, L. & PLARRE, H. 2018b. Genotyping of *Candidatus* *Syngnamydia salmonis* (Chlamydiales; Simkaniaceae) co-cultured in *Paramoeba perurans* (amoebozoa; Paramoebidae). *Archives of Microbiology*, 200, 859-867.
- NYLUND, A., WATANABE, K., NYLUND, S., ARNESEN, C. E. & KARLSBAKK, E. 2009a. Nytt patogen - gammel sykdom. *Norsk Fiskeoppdrett*, 34, 44-49.

- NYLUND, A., WATANABE, K., NYLUND, S., KARLSEN, M., SÆTHER, P., ARNESEN, C. & KARLSBAKK, E. 2008. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Official Journal of the Virology Division of the International Union of Microbiological Societies*, 153, 1299-1309.
- NYLUND, A., WATANABE, K., NYLUND, S., SÆVAREID, I., ARNESEN, C. E. & KARLSBAKK, E. 2009b. Lakselus er vektor for en ny art mikrosporidie. *Norsk Fiskeoppdrett*, 34, 20-23.
- 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, 41.
- 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, 95-114.
- NYLUND, S., STEIGEN, A., KARLSBAKK, E., PLARRE, H., ANDERSEN, L., KARLSEN, M., WATANABE, K. & NYLUND, A. 2014. Characterization of 'Candidatus *Syngnamydia salmonis*' (Chlamydiales, Simkaniaceae), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Arch Microbiol.*
- NYTRØ, A. V., VIKINGSTAD, E., FOSS, A., HANGSTAD, T. A., REYNOLDS, P., ELIASSEN, G., ELVEGÅRD, T. A., FALK-PETERSEN, I.-B. & IMSLAND, A. K. 2014. The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture*, 434, 296-302.
- OELCKERS, K., VIKE, S., DUESUND, H., GONZALEZ, J., WADSWORTH, S. & NYLUND, A. 2014. *Caligus rogercresseyi* a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, 420-421, 126-132.
- OLSEN, A. B., GULLA, S., STEINUM, T., COLQUHOUN, D. J., NILSEN, H. K. & DUCHAUD, E. 2017. Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. *Veterinary Microbiology*, 205, 39-45.
- OLSEN, A. B., NILSEN, H., SANDLUND, N., MIKKELSEN, H., SØRUM, H. & COLQUHOUN, D. 2011. *Tenacibaculum* sp. associated with winter ulcers in sea-reared Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94, 189-199.
- OLSVIK, P., A., LIE, K., K., JORDAL, A.-E., O., NILSEN, T., O. & HORDVIK, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6, 21.

- OVERTON, K., DEMPSTER, T., OPPELAL, 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, 1398-1417.
- OVERTON, K., SAMSING, F., OPPELAL, F., DALVIN, S., STIEN, L. H. & DEMPSTER, T. 2018. The use and effects of hydrogen peroxide on salmon lice and post-smolt Atlantic salmon. *Aquaculture*, 486, 246-252.
- PALACIOS, G., LOVOLL, M., TENGS, T., HORNIG, M., HUTCHISON, S., HUI, J., KONGTORP, R.-T., SAVJI, N., BUSSETTI, A. V., SOLOVYOV, A., KRISTOFFERSEN, A. B., CELONE, C., STREET, C., TRIFONOV, V., HIRSCHBERG, D. L., RABADAN, R., EGHOLM, M., RIMSTAD, E., LIPKIN, W. I. & LINDENBACH, B. 2010. Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus (Novel Reovirus in Salmon). *PLoS ONE*, 5, e11487.
- PETTERSON, E., SANDBERG, M. & SANTI, N. 2009. Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 32, 477-479.
- PIKE, A. W. 1989. Sea lice — Major pathogens of farmed atlantic salmon. *Parasitology Today*, 5, 291-297.
- 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, 71.
- POPPE, T., DALUM, A. S., RØISLIEN, E., NORDGREEN, J. & HELGESEN, K. O. 2018. Termisk behandling av laks. *Norsk veterinærtidsskrift*, 3, 148-156.
- RITCHIE, G., MORDUE, A. J., PIKE, A. W. & RAE, G. H. 1996. Observations on mating and reproductive behaviour of *Lepeophtheirus salmonis*, Krøyer (Copepoda: Caligidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201, 285-298.
- ROLLAND, J. B. & NYLUND, A. 1998. Infectiousness of organic materials originating in ISA-infected fish and transmission of the disease via salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Bull.Eur.Ass. Fish Path*, 18(5), 173-180.
- ROTH, B. 2016. Avlusing av laksefisk med Optilicer: Effekt på avlusing og fiskevelferd.
- SAYER, M. D. J. & READER, J. P. 1996. Exposure of goldsinny, rock cook and corkwing wrasse to low temperature and low salinity: survival, blood physiology and seasonal variation. *Journal of Fish Biology*, 49, 41-63.
- SEVATDAL, S. & HORSBERG, T. E. 2003. Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) against the pyrethroid deltamethrin using bioassays and probit modelling. *Aquaculture*, 218, 21-31.

- SKERN-MAURITZEN, R., TORRISSEN, O. & GLOVER, K. A. 2014. Pacific and Atlantic *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1838) are allopatric subspecies: *Lepeophtheirus salmonis salmonis* and *L. salmonis oncorhynchi* subspecies novo. *BMC genetics*, 15, 32.
- SKIFTESVIK, A. B., BLOM, G., AGNALT, A.-L., DURIF, C. M. F., BROWMAN, H. I., BJELLAND, R. M., HARKESTAD, L. S., FARESTVEIT, E., PAULSEN, O. I., FAUSKE, M., HAVELIN, T., JOHNSEN, K. & MORTENSEN, S. 2014. Wrasse (Labridae) as cleaner fish in salmonid aquaculture – The Hardangerfjord as a case study. *Marine Biology Research*, 10, 289-300.
- SKJELSTAD, H. R., BORNØ, G., FLESJÅ, K., HANSEN, H., NILSEN, H., WASMUTH, M. A. & B., H. 2008. Helsesituasjonen hos oppdrettsfisk 2007.
- SMÅGE, S. B., BREVIK, Ø. J., FRISCH, K., WATANABE, K., DUESUND, H. & NYLUND, A. 2017. Concurrent jellyfish blooms and tenacibaculosis outbreaks in Northern Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar*) farms. *PLoS ONE*, 12, e0187476.
- SMÅGE, S. B., FRISCH, K., VOLD, V., DUESUND, H., BREVIK, Ø. J., OLSEN, R. H., SJAATIL, S. T., KLEVAN, A., BRUDESETH, B., WATANABE, K. & NYLUND, A. 2018. Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum finnmarkense* and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. *Aquaculture*, 495, 858-864.
- SOMMERSET, I., WALDE, C. S., JENSEN, B. B., BORNØ, G., HAUKAAS, A. & BRUN, E. R. 2020. Fiskehelserapporten 2019.
- STEFANSSON, S. O., MCCORMICK, S. D., EBBESSON, L. O. E. & BJÖRNSSON, B. T. 2008. *Smoltification*.
- STEINUM, T., KVELLESTAD, A., COLQUHOUN, D. J., HEUM, M., MOHAMMAD, S., GRØNTVEDT, R. N. & FALK, K. 2010. Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Diseases of aquatic organisms*, 91, 201.
- SVEEN, S., ØVERLAND, H., KARLSBAKK, E. & NYLUND, A. 2012. Paranucleospora theridion (Microsporidia) infection dynamics in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* put to sea in spring and autumn. *Diseases of aquatic organisms*, 101, 43.
- TAKSDAL, T., OLSEN, A. B., BJERKÅS, I., HJORTAAS, M. J., DANNEVIG, B. H., GRAHAM, D. A. & MCLOUGHLIN, M. F. 2007. Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *Journal of Fish Diseases*, 30, 545-558.
- TARANGER, G. L., BOXASPEN, K. K., MADHUN, A. S. & SVÅSAND, T. 2010a. Lus som vektor for sykdomsagens. *Risikovurdering - miljøvirkninger av norsk fiskeoppdrett*, 3-10, 41.

- TARANGER, G. L., CARRILLO, M., SCHULZ, R. W., FONTAINE, P., ZANUY, S., FELIP, A., WELTZIEN, F.-A., DUFOUR, S., KARLSEN, Ø., NORBERG, B., ANDERSSON, E. & HANSEN, T. 2010b. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 483-515.
- TAYLOR, R. S., MULLER, W. J., COOK, M. T., KUBE, P. D. & ELLIOTT, N. G. 2009. Gill observations in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) during repeated amoebic gill disease (AGD) field exposure and survival challenge. *Aquaculture*, 290, 1-8.
- TOENSHOFF, E. R., KVELLESTAD, A., MITCHELL, S. O., STEINUM, T., FALK, K., COLQUHOUN, D. J., HORN, M. & OJCIUS, D. M. 2012. A Novel Betaproteobacterial Agent of Gill Epitheliocystis in Seawater Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) ('*Ca. Branchiomonas cysticola*' in Atlantic Salmon). *PLoS ONE*, 7, e32696.
- TOLÅS, I. V. 2012. *Lukket merdssystem - AquaDomen: Effekt på smittedynamikk*. Master, Universitetet i Bergen.
- 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. 36.
- TREASURER, J. W. 2012. Diseases of north European wrasse (Labridae) and possible interactions with cohabited farmed salmon, *Salmo salar* L. Oxford, UK.
- VENDRAMIN, N., KANNIMUTHU, D., OLSEN, A. B., CUENCA, A., TEIGE, L. H., WESSEL, Ø., IBURG, T. M., DAHLE, M. K., RIMSTAD, E., OLESEN, N. J. & BMC, B. 2019. Piscine orthoreovirus subtype 3 (PRV-3) causes heart inflammation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research*, 50, 14.
- WATANABE, K., KARLSEN, M., DEVOLD, M., ISDAL, E., LITLABØ, A. & NYLUND, A. 2006. Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Diseases of aquatic organisms*, 70, 183.
- WESTON, J., VILLOING, S., BREMONT, M., CASTRIC, J., PFEFFER, M., JEWHRST, V., MCLOUGHLIN, M., RODSETH, O., CHRISTIE, K. E., KOUMANS, J. & TODD, D. 2002. Comparison of Two Aquatic Alphaviruses, Salmon Pancreas Disease Virus and Sleeping Disease Virus, by Using Genome Sequence Analysis, Monoclonal Reactivity, and Cross-Infection. *The Journal of Virology*, 76, 6155.
- WIIK, R., ANDERSEN, K., UGLENES, I. & EGIDIUS, E. 1989. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. *Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, Salmo salar, to Vibrio salmonicida, together with effects on the blood cell pattern*, 201-215.

- YOUNG, N. D., CROSBIE, P. B. B., ADAMS, M. B., NOWAK, B. F. & MORRISON, R. N. 2007. *Neoparamoeba perurans* n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal for Parasitology*, 37, 1469-1481.
- AAEN, S. M., AUNSMO, A. & HORSBERG, T. E. 2014. Impact of hydrogen peroxide on hatching ability of egg strings from salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in a field treatment and in a laboratory study with ascending concentrations. *Aquaculture*, 422-423, 167-171.
- AAEN, S. M., HELGESEN, K. O., BAKKE, M. J., KAUR, K. & HORSBERG, T. E. 2015. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*, 31, 72-81.

# 7 Appendiks

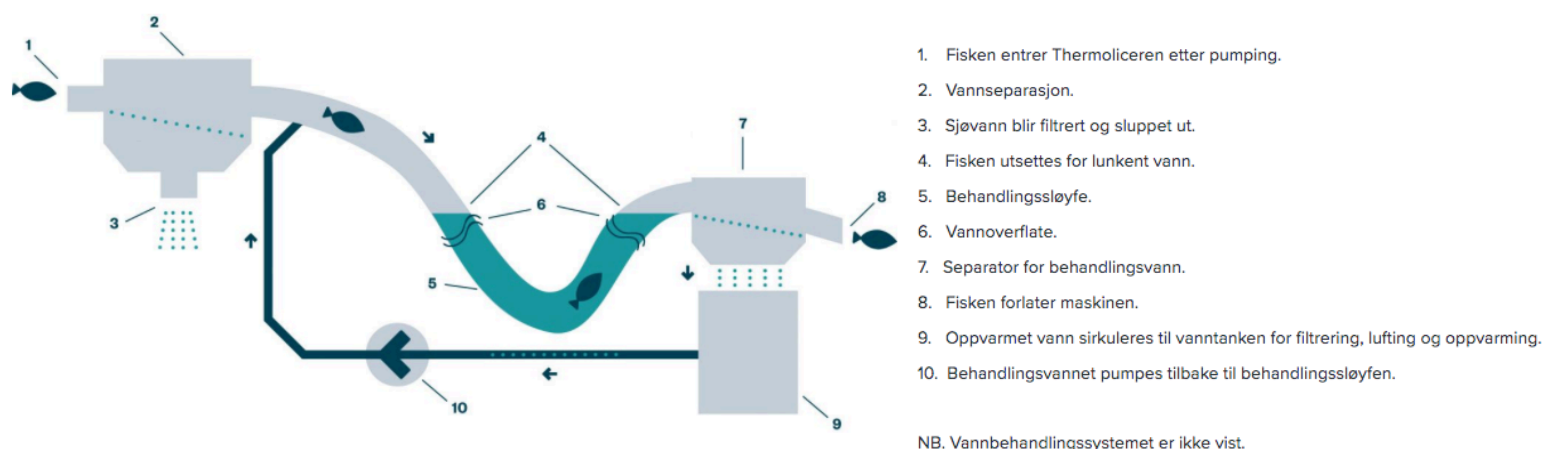
## 7.1 Termiske avlusingsmetodar

### 7.1.1 Thermolicer

#### Maskinen

Thermoliceren er en maskin som utfører badebehandling av fisk. En plutselig økning i vanntemperatur er en velkjent metode for å drepe lus. Vi har utviklet en maskin som gjør dette på en kommersiell skala.

Fisken samles og pumpes inn i maskinen, hvor den passerer gjennom behandlingssløyfen på 25–30 sekunder. Behandlingsvannet holder 30–34 grader avhengig av sjøtemperaturen. Behandlingsvannet filtreres, luftes, tilsettes oksygen og brukes på nytt i systemet. Denne enkle og miljøvennlige behandlingen har en effekt som overgår tradisjonelle behandlingsmidler som kjemikalier og medisiner.



#### I bruk

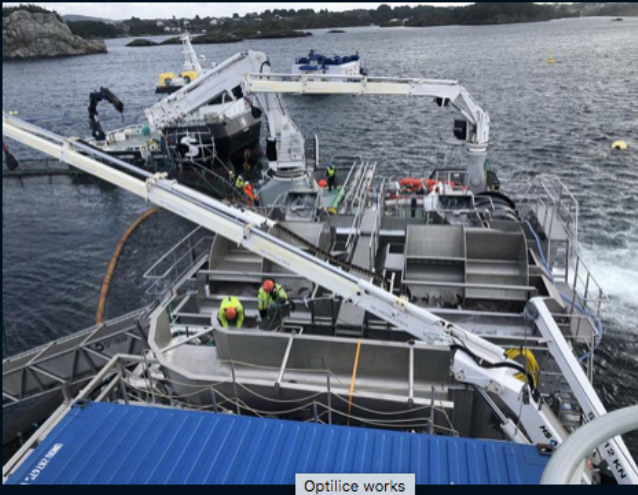
Thermoliceren blir montert på en båt eller lekter og hver maskin kan behandle opp mot 80 tonn per time, avhengig av trengsel og lokale forhold. Fisken samles og pumpes gjennom Thermoliceren og deretter tilbake i samme bur, eller til et tomt bur. Sammen med Thermoliceren får du opplæring og anbefalinger for å sikre at du kan behandle fisken når det trengs, og ikke være avhengig av en tredjepart.

**Figur 7.1.** Prinsippet til Thermolicer, skjermbilte fra produsenten si nettside (<https://www.steinsvik.no/no/produkter/n/seaculture/fiskehelse/thermolicer/>, henta 25.05.2020).



## 7.1.2 Optilicer

# How Optilice 4 works

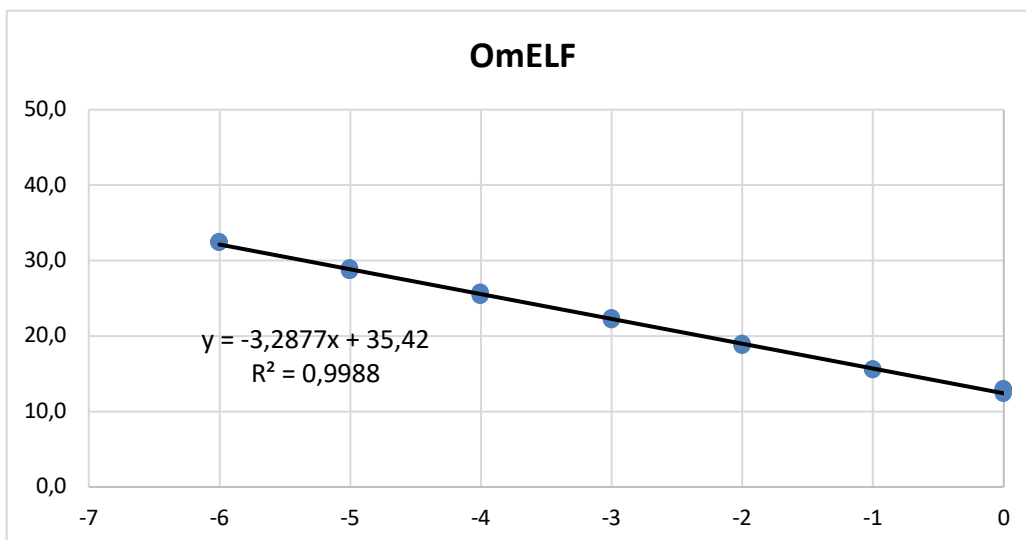


The fish is pumped from the cage for the Optilice 4-treatment, using the SQ 16 fish pumping system. The fish is counted, and then bathed in temperature-controlled water (-1°C – 36 °C seawater or fresh water) in a controlled and time-adjustable time treatment. The underwater circulation of 1000 ltr/sec per line secures a continuous supply of fresh seawater (10 m<sup>3</sup>/hour per line).

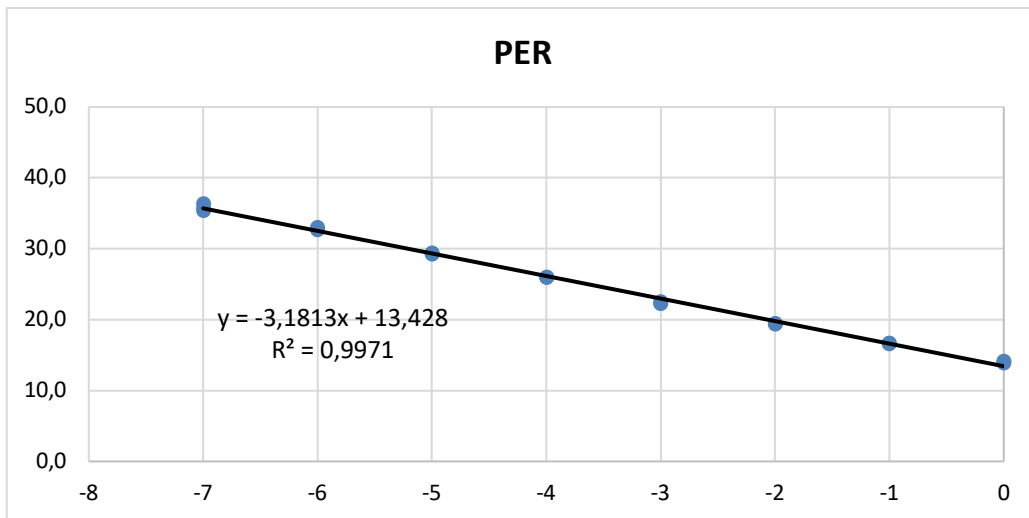
After the treatment, the fish flows back to the cage, and all sea lice are filtered out and destructed. The system comes with an open construction for easy access, control and cleaning, and a flow of fresh seawater in the outfeed-chute/pipe. Optilice 4 provides a reliable, robust and good monitoring of fish welfare. The system can be combined with grading-equipment and is Optimar Commander compatible.

**Figur 7.2.** Prinsippet til Optilicer, skjermbilete frå produsenten si nettside (<https://optimar.no/optilice.html>, henta 25.05.2020).

## 7.2 Effektivitetstest



**Figur 7.3.** Standardkurve for OmELF



**Figur 7.4.** Standardkurve for PER

