

Mekanisk avlusning

FHF prosjekt (901514): Effekter av behandling mot lakselus, amøbegjellesykdom (AGD), og not rengjøring på gjellehelse hos laks i oppdrett.

Hovedmål for prosjektet

- Hovedmålet var å fremskaffe ny kunnskap som skulle kunne resultere i anbefalte tiltak (driftstiltak) for å oppnå bedre gjellehelse hos laks i sjø og følgelig redusere tap knyttet til drift av sjøanlegg.
- Prosjektet har fokusert på identifisering av risikofaktorer (miljøstress, patogener, og endringer i gjellemikrobiota) for utvikling av gjellelidelser, og
- indikatorer (patologi, immunresponser, mikroparasitt prevalens - tetthet - diversitet) som kan brukes til objektiv vurdering av gjellehelse før og etter stressbelastninger (mekanisks avlusing, bruk av ferskvann til behandling mot AGD, og notvask).

Prosjekt gruppe

• Forskere:

- Are Nylund, Universitetet i Bergen
- Linda Andersen, Industrielaboratoriet
- Steffen Blindheim, Industrielaboratoriet
- Trond Isaksen, Uni Research,
- Stian Nylund, Pharmaq Analytiq
- Alf Dalum, Pharmaq Analytiq
- Simon MacKenzie, University of Stirling
- Ben GJ Clokie, University of Stirling

• Ingeniører:

- Lindsey Moore
- Christiane Trösse

Masterstudenter:

- Birgit Kvåle
- Elisabeth Napsøy
- Søgni Wiik
- Pernille L. Lyng
- Oda Gjerde
- Anna N Johansen

Ingeniører:

- Erwan Lagadec
- Faezeh Mohammadi
- Heidrun Plarre

Industripartnere

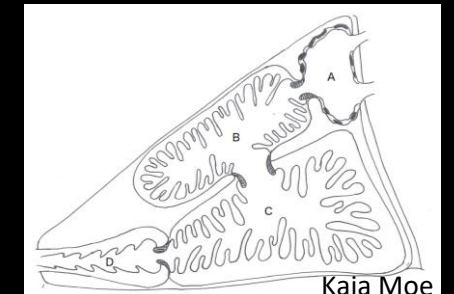
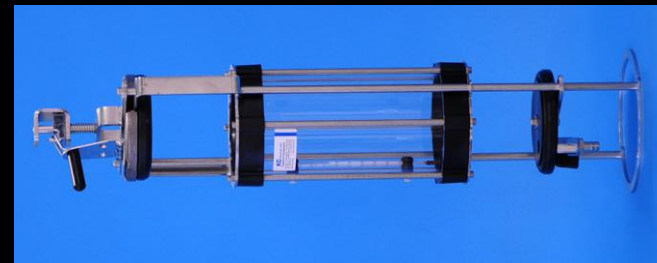
- Blom Fiskeoppdrett AS
 - Bolaks AS
 - Bremnes Seashore
- Lerøy Seafood Group ASA
 - Firda Sjøfarmer AS

Mekanisk avlusing

- I prosjektet fulgte vi bruk av termisk avlusing i forbindelse med vår, sommer og høst avlusing.
- I tillegg ble termisk behandling testet eksperimentelt, dvs eksponering av eksperimentelt smittet laks for 34 °C i 30 sekunder.
- Behandling av laks holdt i kjølt ferskvann før termisk behandling ble også testet i forbindelse med vår, sommer og høst avlusing.

Prøvetaking på lokalitet i tillegg til data fra lokalitet

- Vurdering av fiskens ytre utseende
 - Registrering av vekt, lengde
 - Hudskader
 - Telling av lakselus
 - Gjelle score
 - Vurdering av viscera
-
- Vannprøver og sjøtemperatur på 1 og 5 meter.
 - Prøvetaking for:
 - For påvisning av mikroparasitter (Real time RT PCR analyser (gjeller, hjerte og nyren)).
 - Histologi (gjelle og hjerte)
 - Gjellelev til mikrobiota kartlegging
 - Gjellelev for kartlegging av immunresponser



Real time RT PCR test for mikroparasitter

- Virus

- Infectious salmon anaemia virus
- Salmonid alphavirus
- Infectious pancreatic necrosis virus
- Piscine orthoreovirus (PRV1 / PRV3)
- Piscine myocarditis virus
- Atlantic salmon calicivirus
- Salmonid gill poxvirus

- Bakterier:

- *Moritella viscosa*
- *Tenacibaculum maritimum*
- *Tenacibaculum finnmarkense*
- *Yersinia ruckeri*
- *Candidatus Branchiomonas cysticola*
- *Candidatus Syngnamydia salmonis*
- *Candidatus Clavichlamydia salmonicola*
- *Candidatus Piscichlamydia salmonis*

Parasitter:

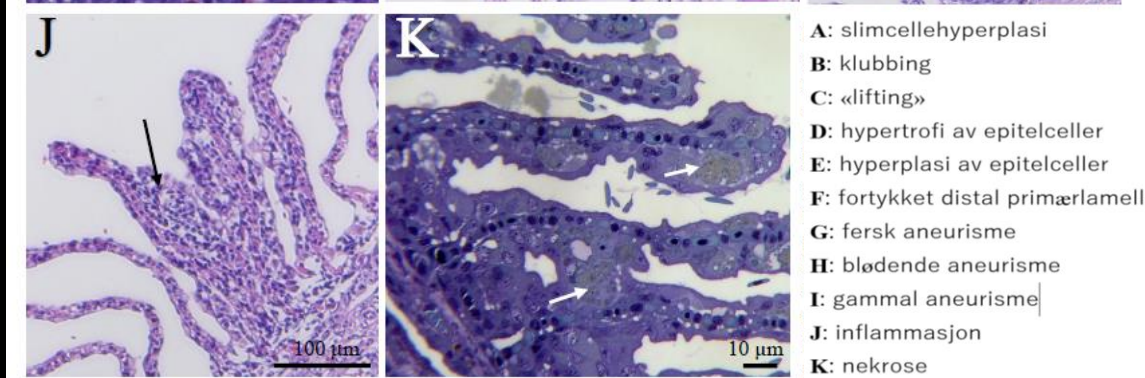
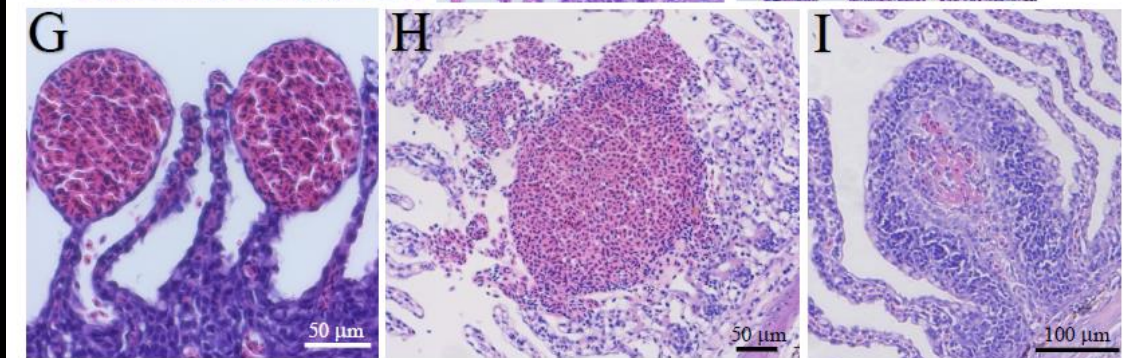
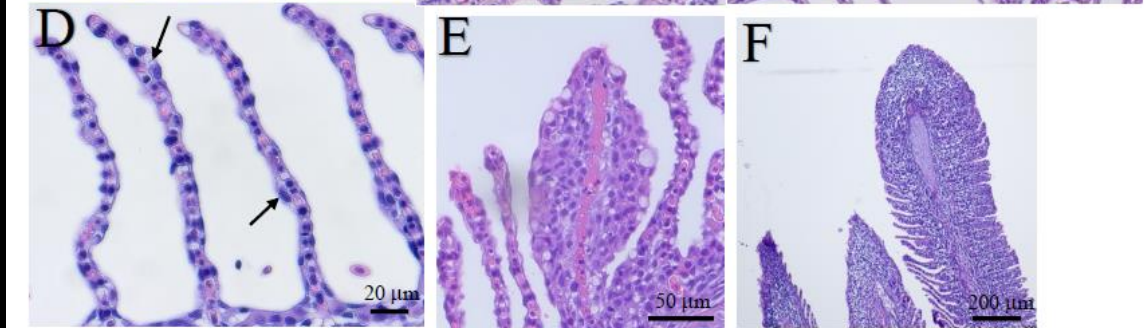
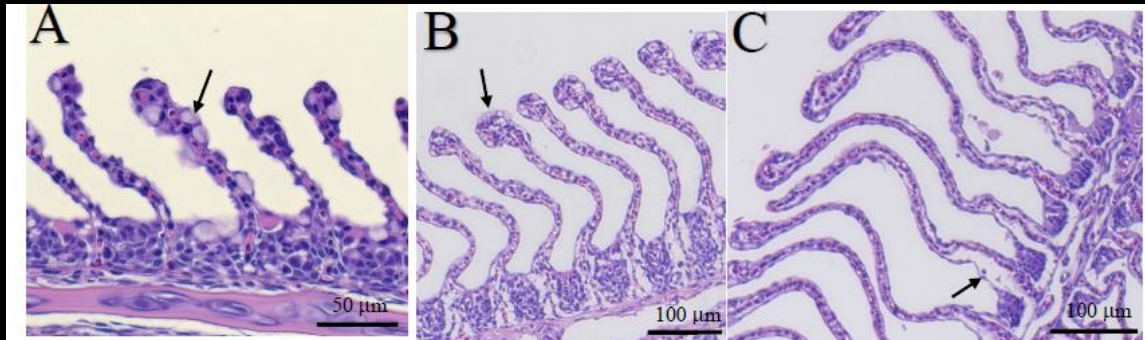
- Parvicapsula pseudobranchicola*
- Paramoeba perurans* (Syn. Neoparamoeba perurans)
- Ichthyobodo* spp.
- Paranucleospora theridion*
- Salmoxcellia vastator*

Kontroller:

- Elongeringsfaktor fra laks
- Elongeringsfaktor fra regnbueørret

To negative kontroller for hver tiende prøve:

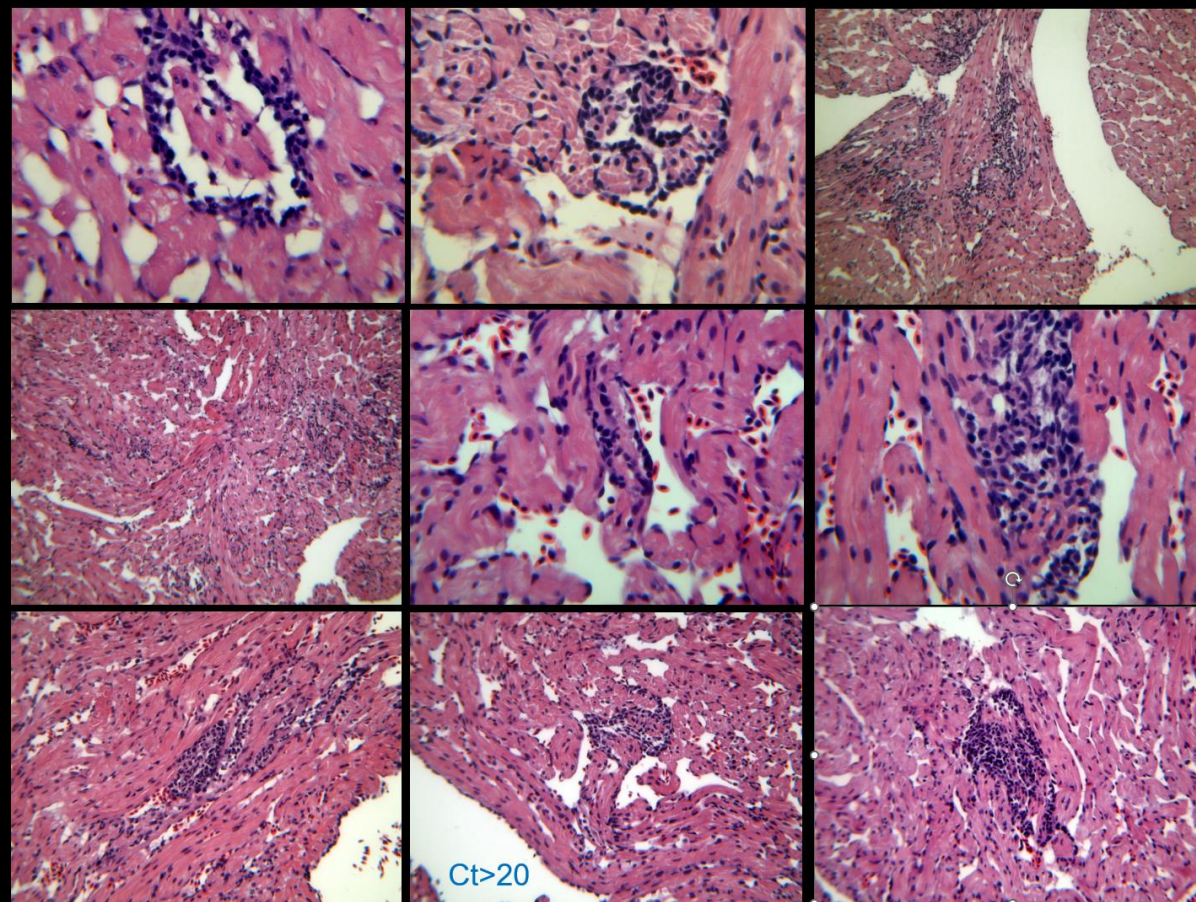
Rensekontroll og Negativ templat kontroll



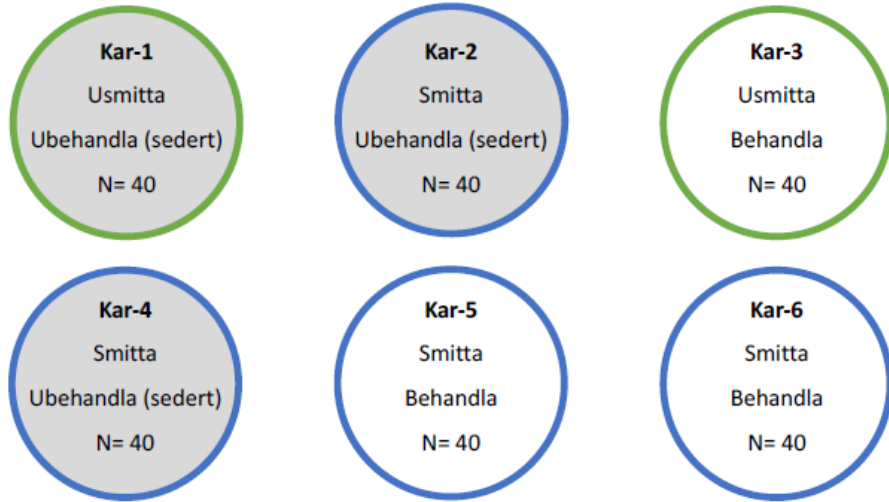
- A: slimcellehyperplasi
- B: klubbing
- C: «lifting»
- D: hypertrofi av epitelceller
- E: hyperplasi av epitelceller
- F: fortykket distal primærlamelle
- G: fersk aneurisme
- H: blødende aneurisme
- I: gammel aneurisme
- J: inflammasjon
- K: nekrose

Histologi på gjeller fokuserte på 11 karakterer (A – K)
Score: 0 - 3

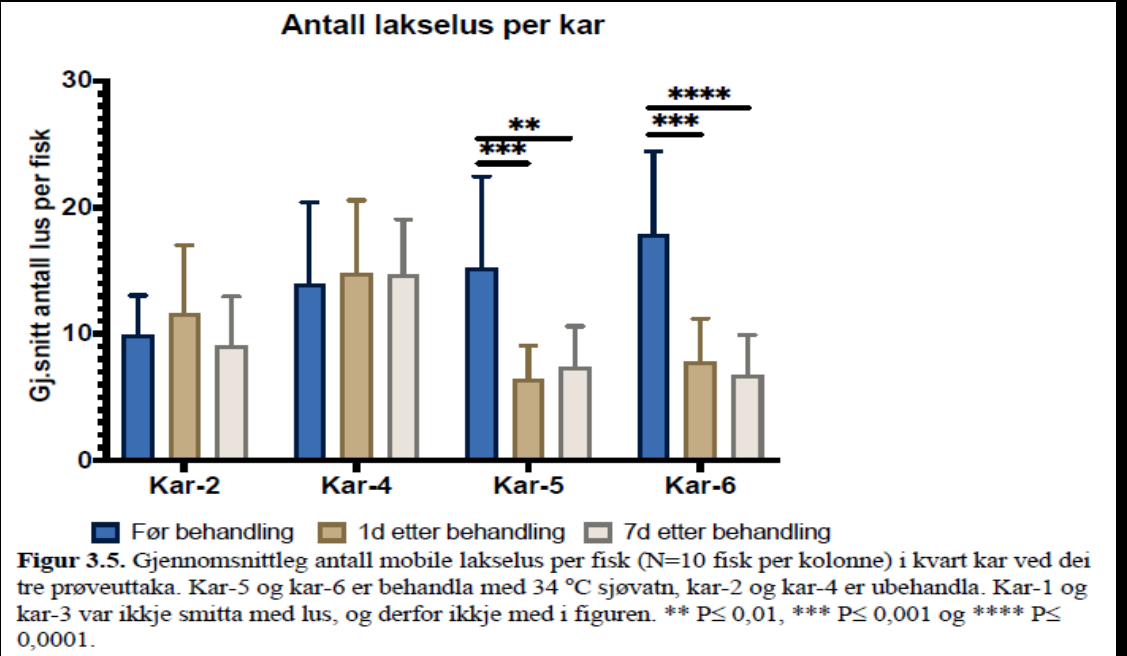
Histologi på hjerte fokuserte endringer
assosiert med PD, HSMB og CMS.



Termisk behandling i eksperimentelt forsøk

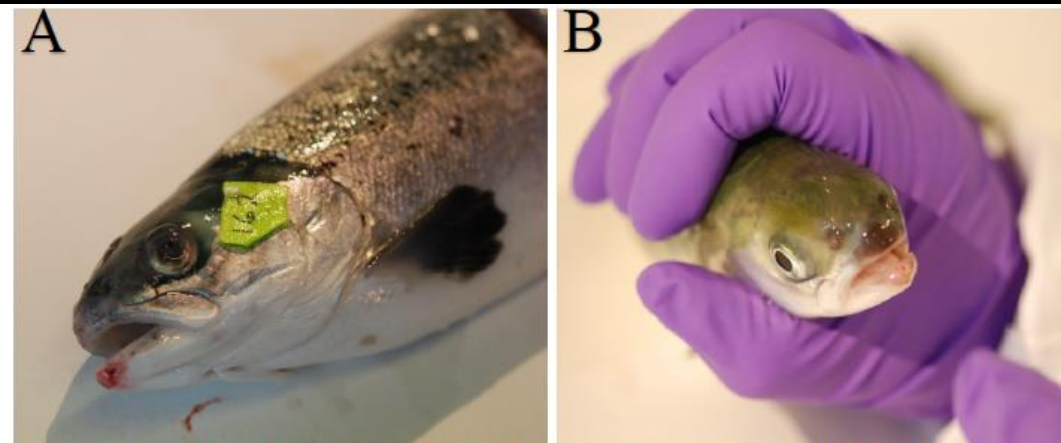


Figur 2.1. Skjematisert oversikt over kara i forsøket (N= antall fisk). Grøn ring syner kara som ikkje vart smitta med copepodittar, blå ring rundt kara som vart smitta. Dei grå kara vart ikkje behandla med varmt vatn, dei kvite kara vart behandla.

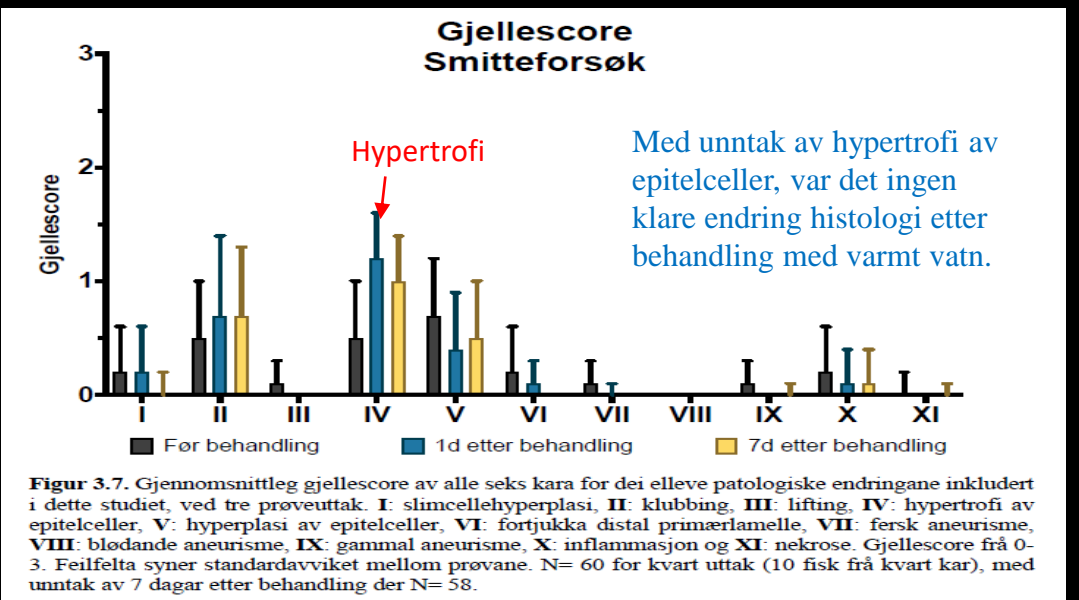


Figur 3.5. Gjennomsnittleg antall mobile lakselus per fisk (N=10 fisk per kolonne) i kvart kar ved dei tre prøveuttaka. Kar-5 og kar-6 er behandla med 34 °C sjøvotn, kar-2 og kar-4 er ubehandla. Kar-1 og kar-3 var ikkje smitta med lus, og derfor ikkje med i figuren. ** P < 0,01, *** P < 0,001 og ****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

NB: Det ble observert kjeveerosjon hos fiskene før behandling



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



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: blodande aneurisme, IX: gammel 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.

Gene expression after thermal treatment

In laboratory trials no significant differences were observed at any time point measured

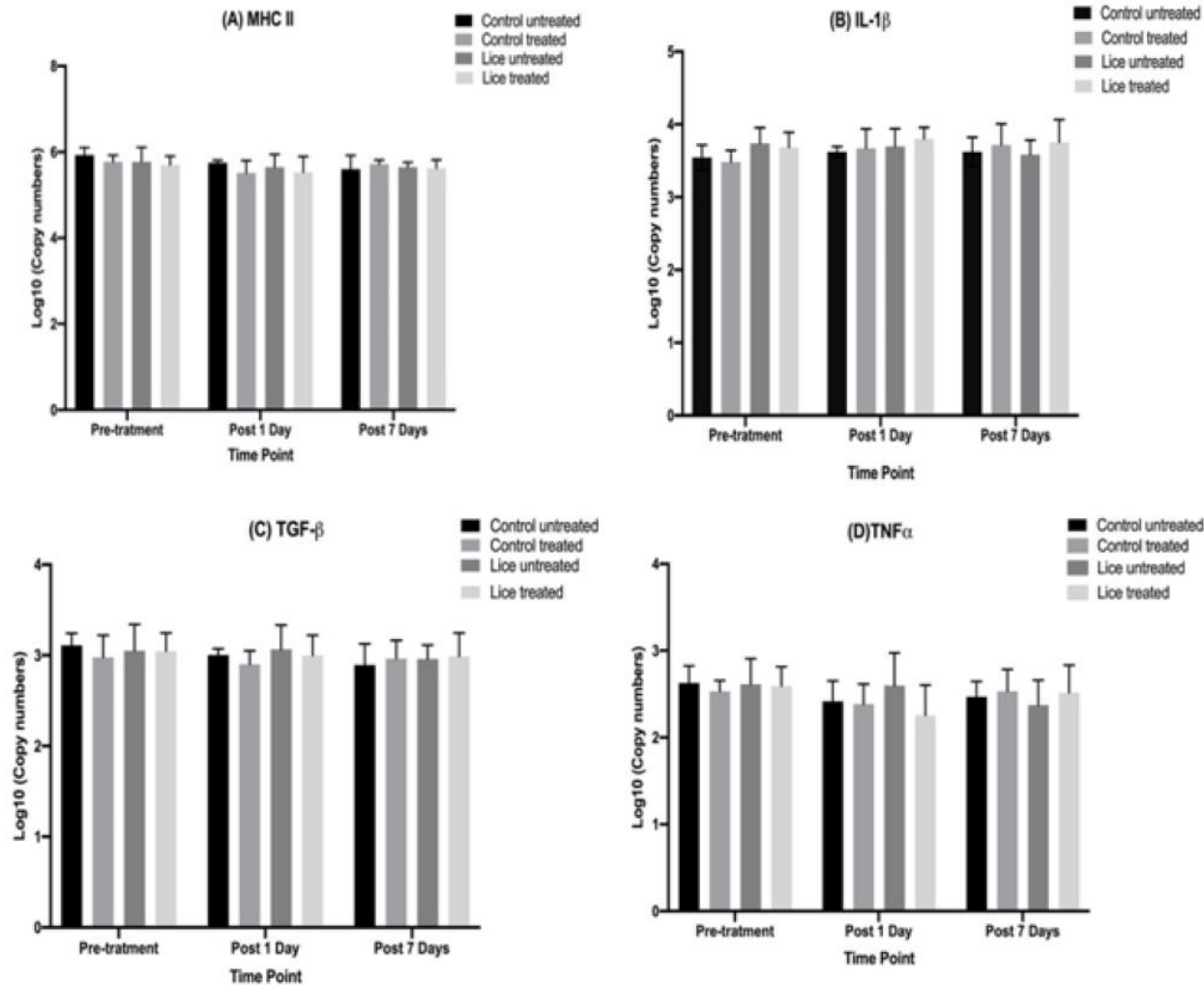


Figure 11: Immune response of gills upon Thermolicer treatment at three time points; pre-treatment, 1 day and 7 days post treatment. Absolute expression of), MHC II (A), IL-1 β (B TGF- β (C) and TNF α (D) in gills upon thermal treatment were investigated. Data are mean \pm SD at three time points.

Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison was conducted to analyse the data with the level of significance of $p < 0.05$ using GraphPad Prism version 8.0. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$ and ***= $p < 0.0005$ denote significantly different.

Konklusjon eksperimentell termisk behandling

- Smitte med lakselus endret mikrobiota diversiteten på gjellene hos laksen og føre til mindre diversitet hos smittet fisk versus kontroll fisk.
- Termisk behandling førte ikke til endringer i immunrespons.
- Termisk behandling førte ikke til alvorlig endring i gjellehelse hos fisken, men en økning i hypertrofi ble registrert en dag etter behandling og var fallende syv dager etter behandling.
- Behandlingen førte ikke til økt dødelig, men umiddelbart etter behandling ble det observert mørke snuter hos noen fisk.
- Behandlingen førte til en signifikant reduksjon i antall lakselus.

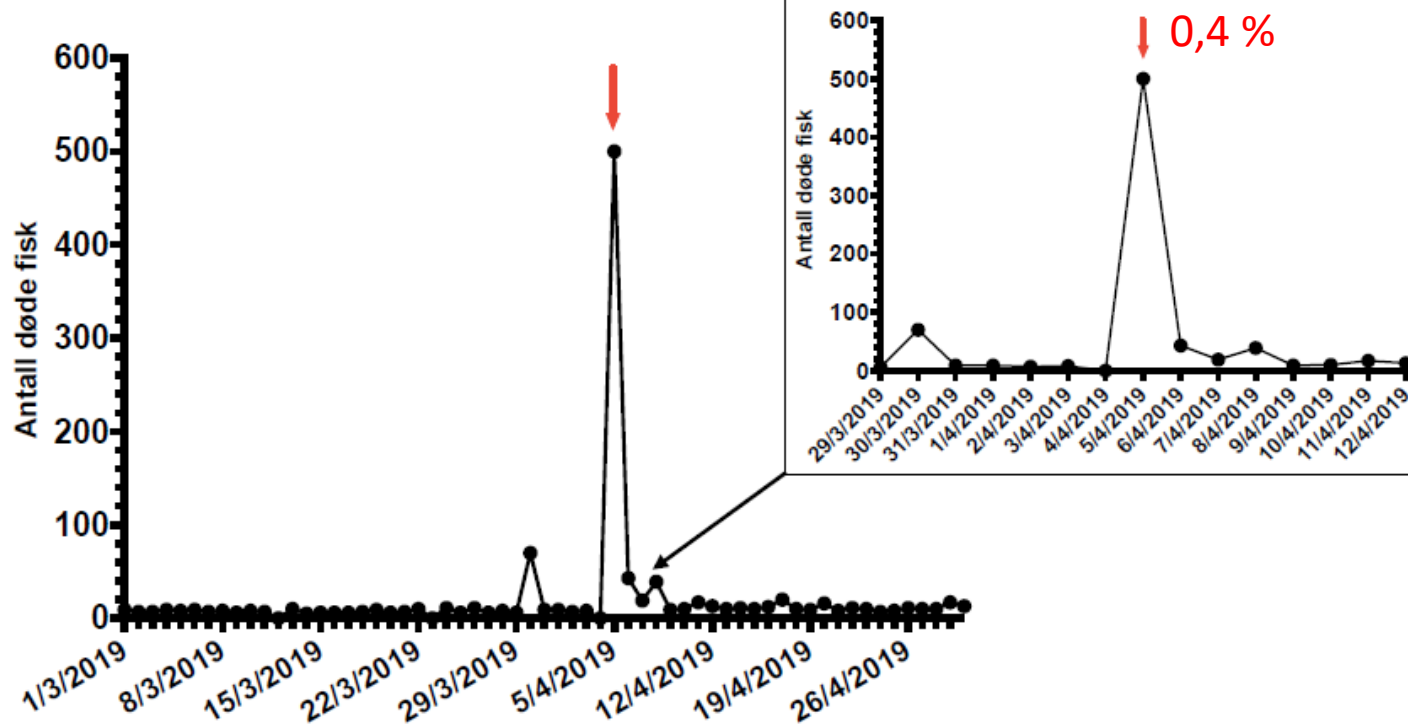
Thermolicer mars 2019:

Temp i sjø ca 6.0 °C. Behandling 34 °C i 30 sekunder. $\Delta = 28$ °C.

- Tap av fisk på behandlingsdagen var 0,4 %.

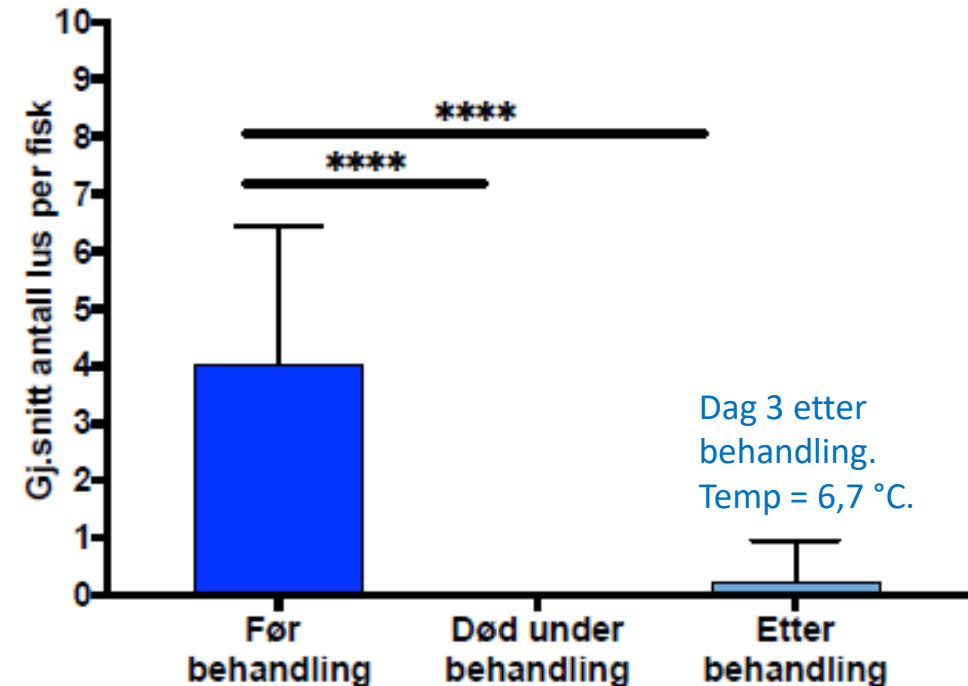
Reduksjon i bevegelige stadier 4 - 0 - 0,3

Dødelegheit behandla merd
Lokalitet-A

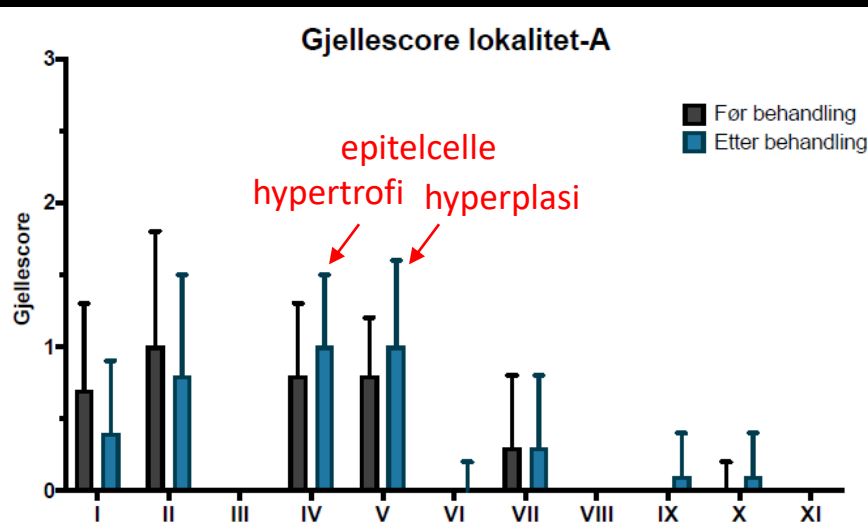


A

Mobile lakselus per fisk
Aktuell merd - lokalitet-A

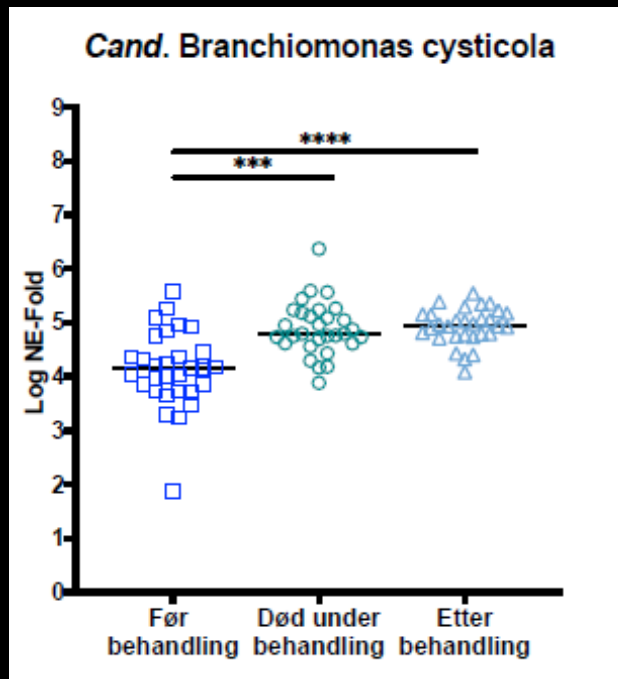


Histo-score

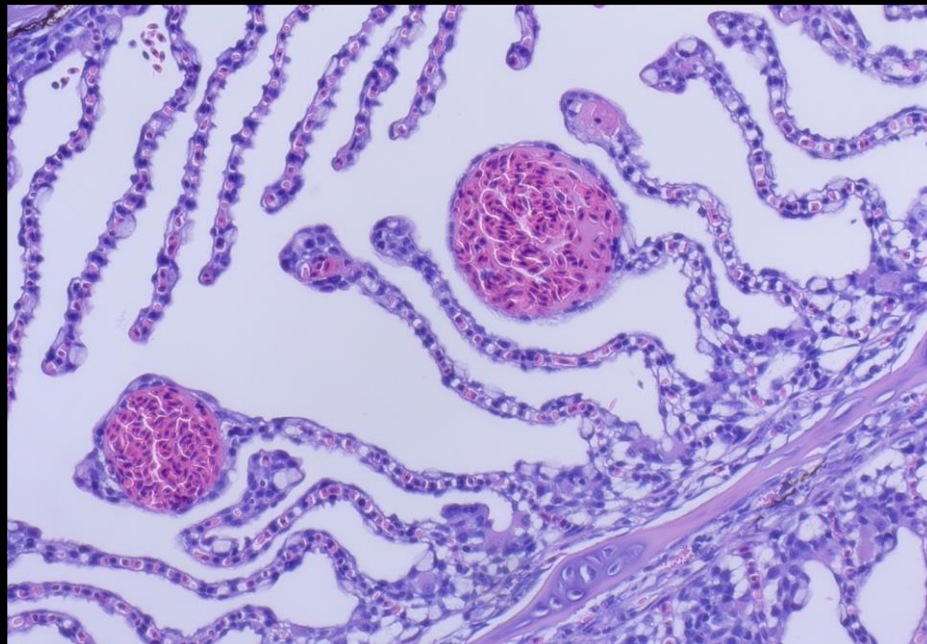
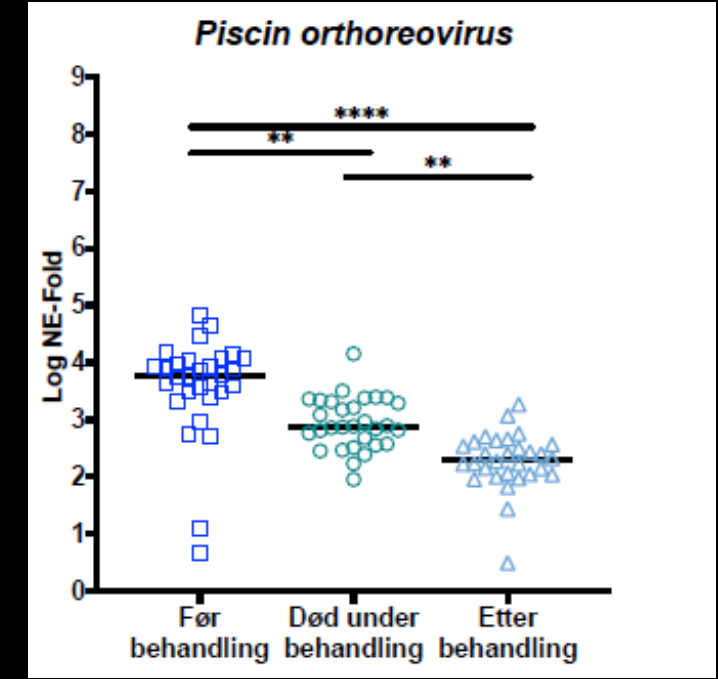


Figur 3.25. Gjennomsnittlig gjellescore for dei elleve patologiske endringane inkludert i dette studiet, ved uttak før og etter behandling med Thermolicer på lokalitet-A. I: slimcellehyperplasi, II: klubbing, III: lifting, IV: hypertrofi av epitelceller, V: hyperplasi av epitelceller, VI: fortjukka distal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

Belastning (densitet)



Belastning (densitet)



Alle de 90 analyserte prøvene (tatt ut før, under og etter behandling) var negative for:

SAV, SGPV, ASCV, IPNV, Salmonid herpesvirus 4 (SalH-4), *Tenacibaculum maritimum*, og *Paramoeba perurans*.

	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)	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 spp.</i> (Gj)	34,7	30,1 - 38,9	17	33,0	27,9 - 35,3	73	34,2	31,4 - 36,9	43
<i>Tenacibaculum spp.</i> (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

Konklusjon anlegg A

- Behandling med Thermolicer gav en signifikant reduksjon i mengde lakselus på fisken.
- Tap av fisk i forbindelse med behandlingen var moderat (0,4 %)
- Behandlingen hadde ikke noen klar negativ signifikant innvirkning på gjellehelsen.
- En svak økning i epitelcelle hyperplasi og hypertrofi ble observert

Thermolicer august 2019

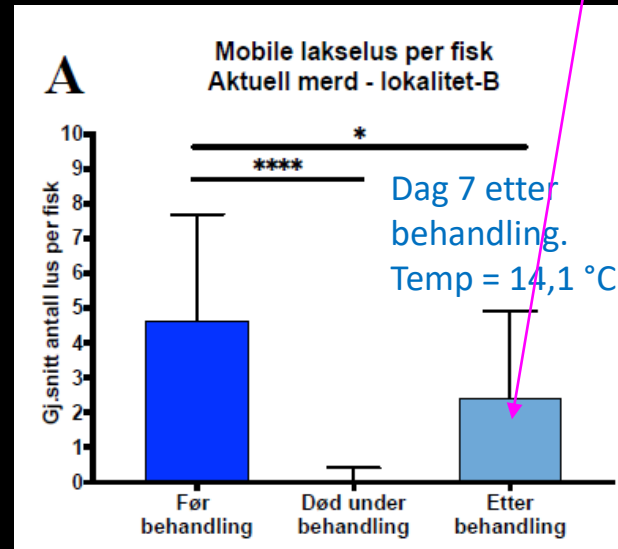
Temp. i sjø ca 14,1 °C. Behandling 33,5 °C i 30 sekunder. $\Delta = 19.4$ °C

Alle fiskene hadde sår før behandling



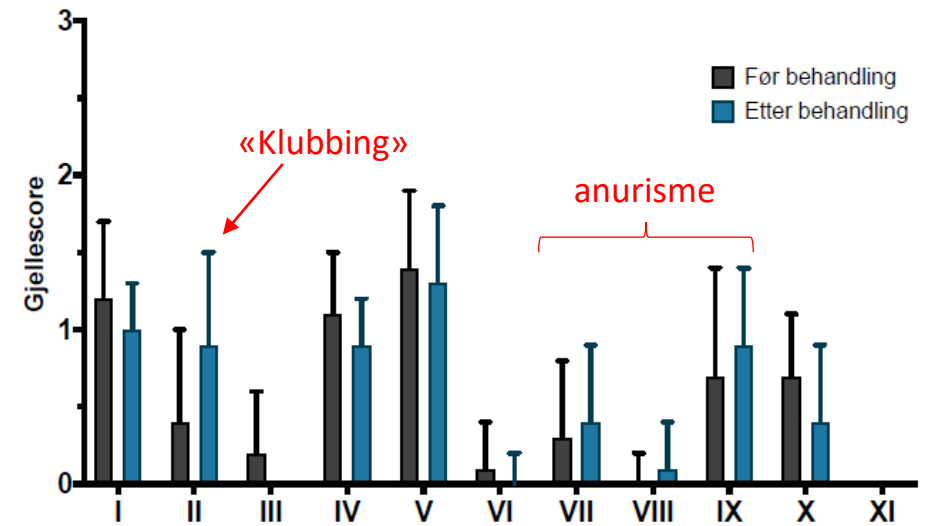
0,9 % av laksen døde under behandling i merden

1. Chalimus til preadult = ca 6 dager
2. Chalimus til preadult = ca 2 dager



De 90 analyserte prøvene var negative for:
SAV, SalH-4, ASCV, IPNV,
Paramoeba pemaquidensis, *Cand.*
C. salmonicola, og *Yersinia ruckeri*.

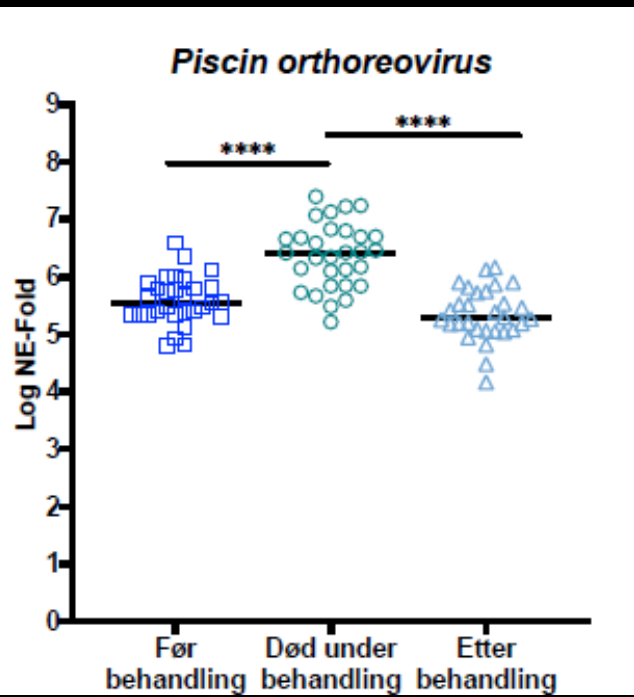
Gjellescore lokalitet-B



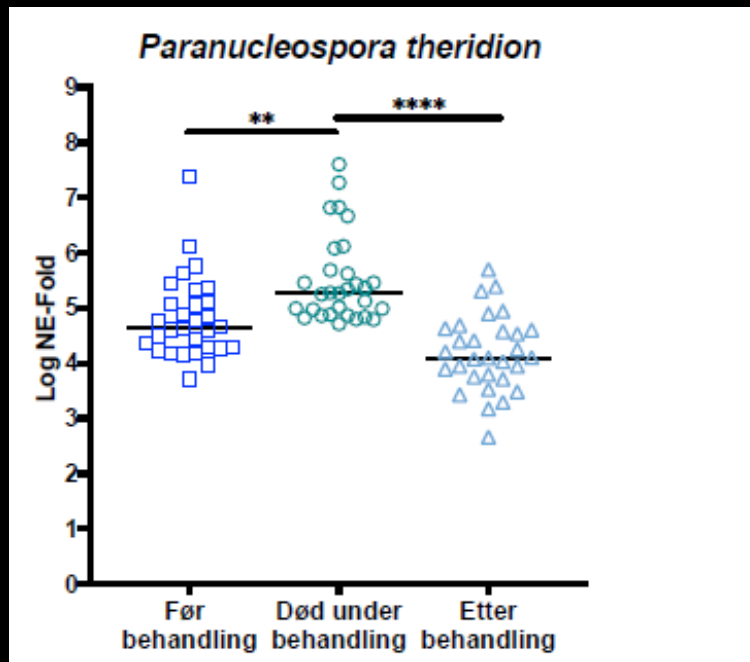
Figur 3.46. Gjennomsnittlig gjellescore for dei elleve patologiske endringane inkludert i dette studiet, ved uttak før og etter behandling med Thermolicer på lokalitet-B. I: slimcellehyperplasi, II: klubbing, III: lifting, IV: hypertrofi av epitelceller, V: hyperplasi av epitelceller, VI: fortjukka distal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

	Før behandling			Død under behandling			Etter behandling		
	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

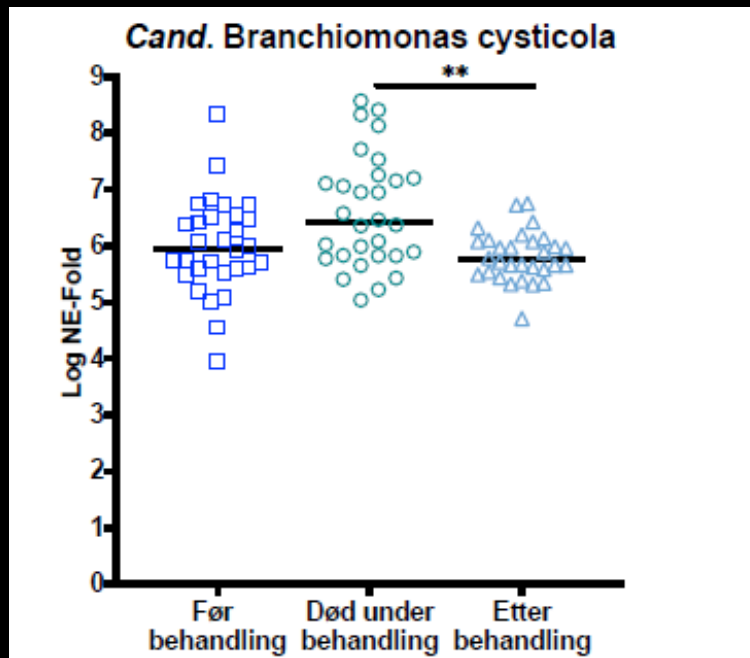
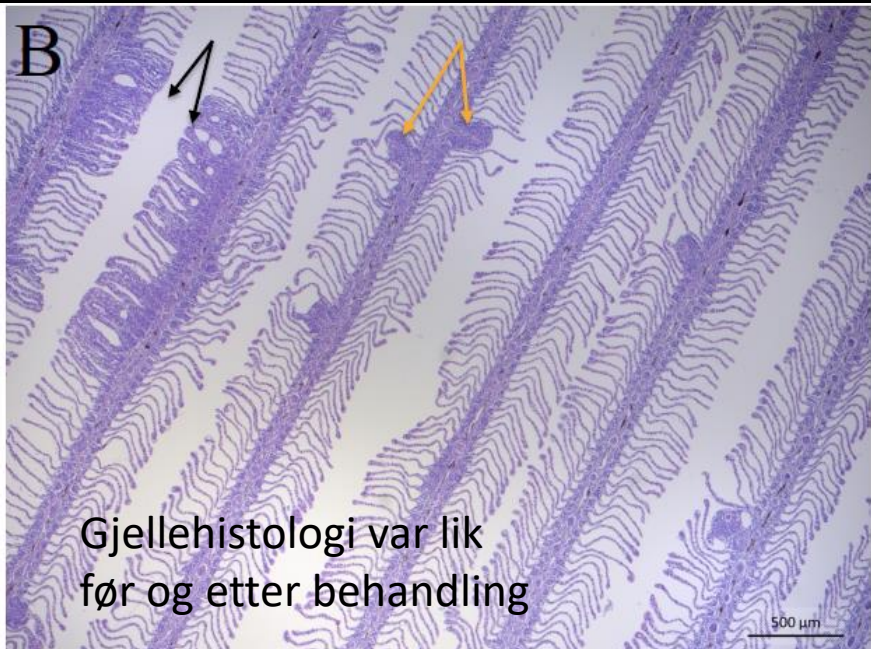
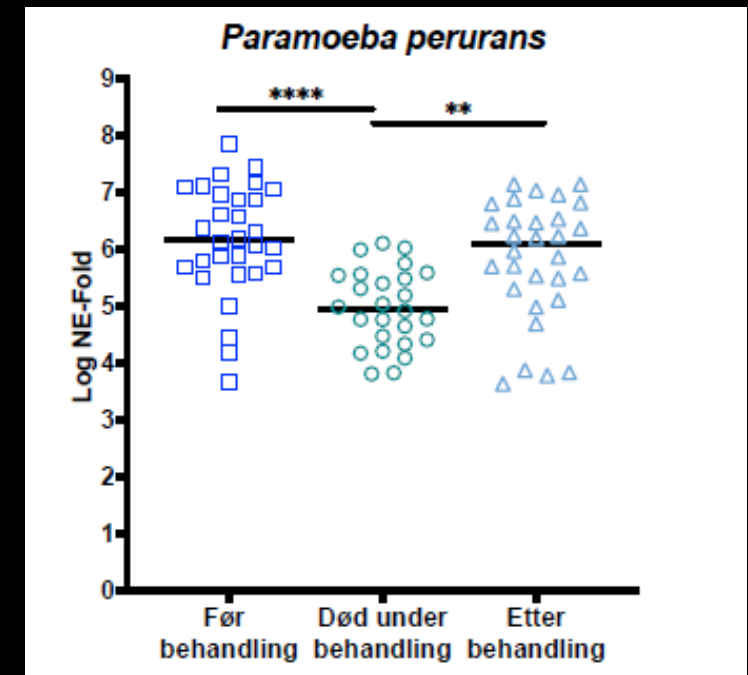
Belastning -Nyren



Belastning - Gjelle



Belastning - Gjelle

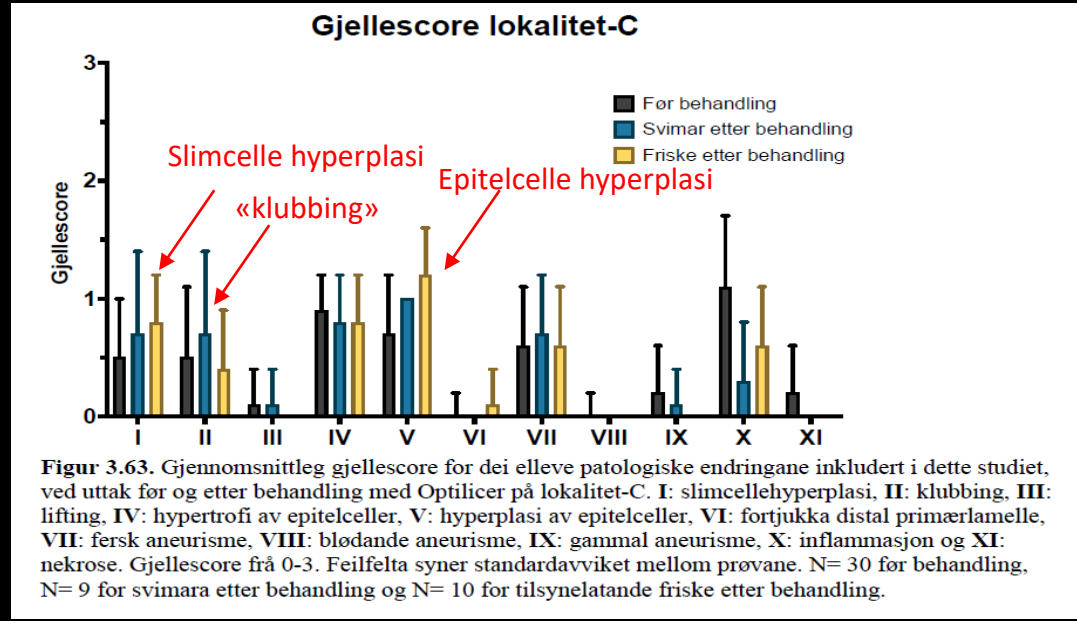


Konklusjon anlegg B

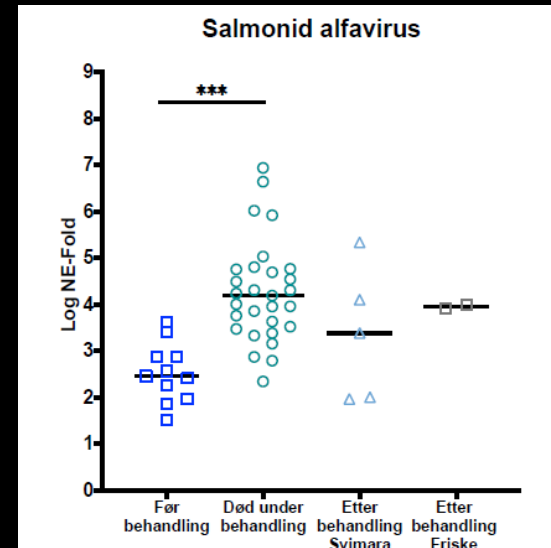
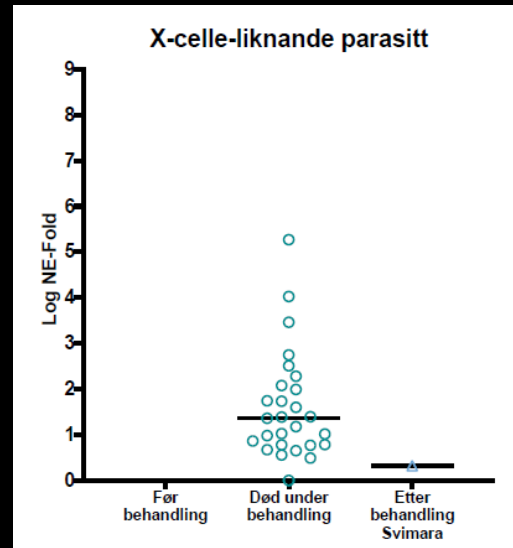
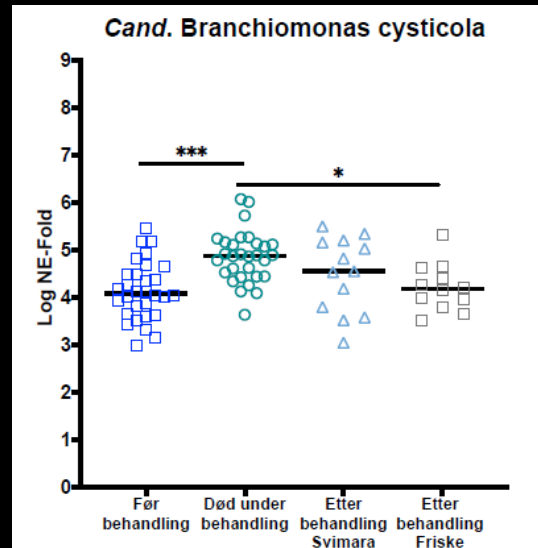
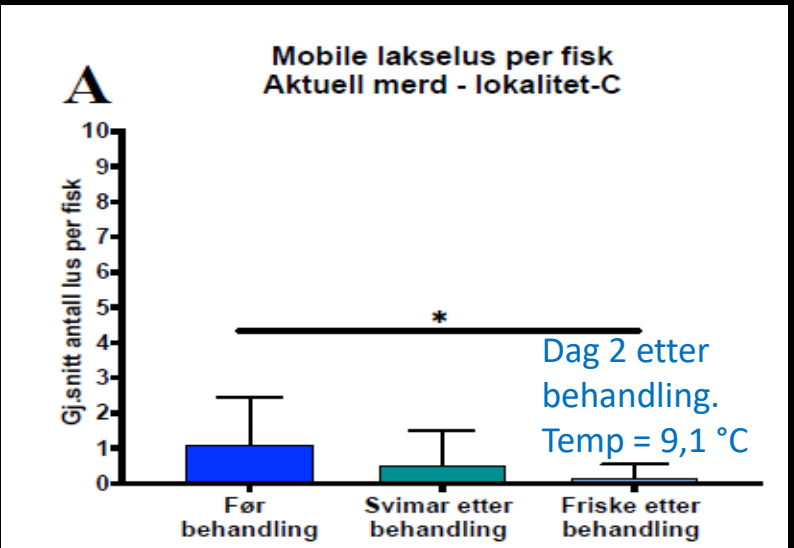
- Behandling med Thermolicer gav en signifikant reduksjon i mengde lakselus på fisken.
- Tap av fisk i forbindelse med behandlingen var 0,9 %, og de fiskene som døde hadde en høyere belastning med PRV1, *P. theridion* og *Cand. B. cysticola* enn fisk før og etter behandling.
- Behandlingen hadde ikke noen klar negativ innvirkning på gjellehelsen.
- Hudsår ble observert hos fiskene både før og etter behandling og kan være et resultat en hyppig frekvens med termisk avlusing (trenging og pumping av fisk) i anlegget.

Optilicer november 2019 (Regnbueørret)

Temp. i sjø ca 11,6 °C. Behandling 33,5 °C i 30 sekunder. $\Delta = 19.4$ °C



Det var høy dødelighet i forbindelse med behandling (tall ikke gitt).



Konklusjon anlegg C

- Behandling med Optilicer gav en signifikant reduksjon i mengde lakselus på fisken.
- Tap av fisk i forbindelse med behandlingen var høy (tall ikke gitt), og de fiskene som døde hadde en høy belastning med SAV, *Cand. B. cysticola* og *Salmoxcellia vastator* enn fisk før behandling.
- Behandlingen resulterte i en økning i slimcellehyperplasi, «klubbing», og epitelcelle hyperplasi.
- Det ble ikke observert hudsår etter behandlingen.
- Dødeligheten i forbindelse med behandling var i følge oppdretter et resultat av feil under trenging og pumping av fisken

Gene expression after thermal treatment in field

Significant differences were observed in all samples from field trials tested post-treatment

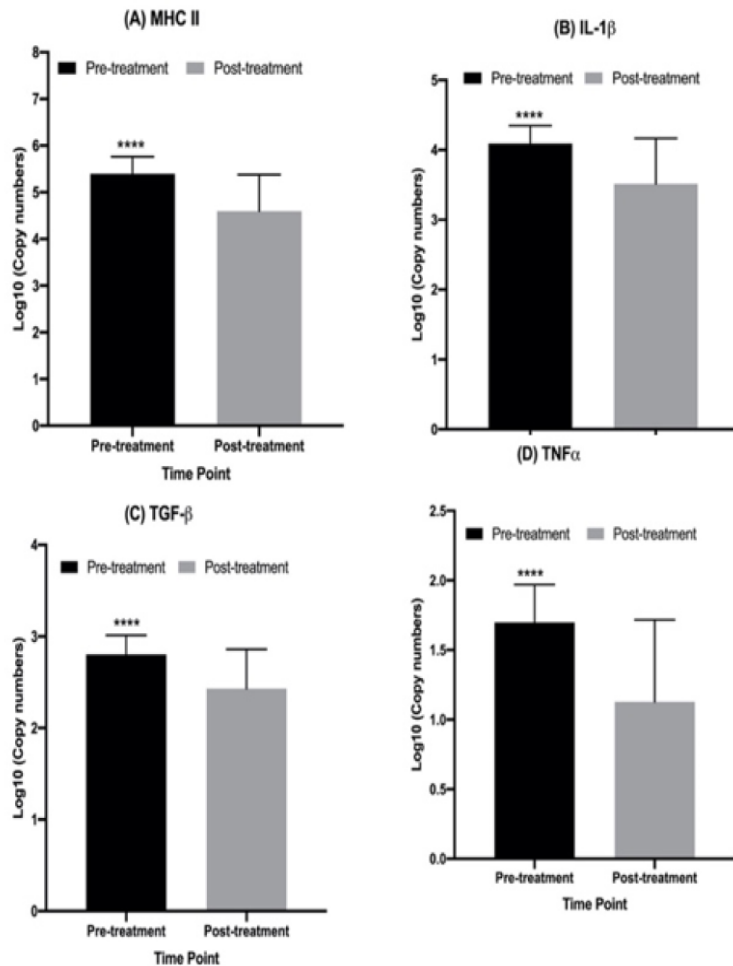


Figure 10: Immune response of gills upon Thermolicer treatment at two time points; pre-treatment and post treatment. Absolute expression of (A) MHC II (B), IL-1β (C), TGF-β and (D) TNFα in gills upon thermal treatment were investigated. Data are mean ± SD at three time points.

Unpaired t test was conducted to analyse the data with the level of significance of $p < 0.05$ using GraphPad Prism version 8.0. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$ and ***= $p < 0.0005$ denote significantly different.

Measured targets represent antigen presentation and both pro- and anti-inflammatory cytokines.

The results suggest that *Thermolicer* treatment in the field has a profound effect upon the regulation of the immune system whereas in controlled laboratory trials such an effect cannot be reproduced.

Therefore, temperature shock itself may not be the main driver for the observed effect

Innvirkning av termisk behandling på gjelle mikrobiota

- I et tilfelle ble det registrert en signifikant økning i gjellemikrobiota diversitet etter termisk behandling, mens det i et annet tilfelle ikke ble påvist noen signifikant endring i mikrobiota før og etter behandling.
- Forskjellene kan være et resultat av at fisken i de to anleggene hadde forskjellig helsestatus før behandling.
- Det ene anlegget hadde AGD, PGI, og var i tillegg smittet med PMCV, og hadde gjennomgått flere avlusninger i perioden før behandlingen (høst avlusing), men fisken i det andre anlegget var ikke diagnostisert med alvorlig gjellesykdom før behandling (vår avlusing).
- Det er vanskelig å vurdere situasjonen i anlegg C, men dødeligheten ble forklart som et resultat av patogenbelastning i kombinasjon med feil under trenging og pumping på vei inn i Optilizeren.

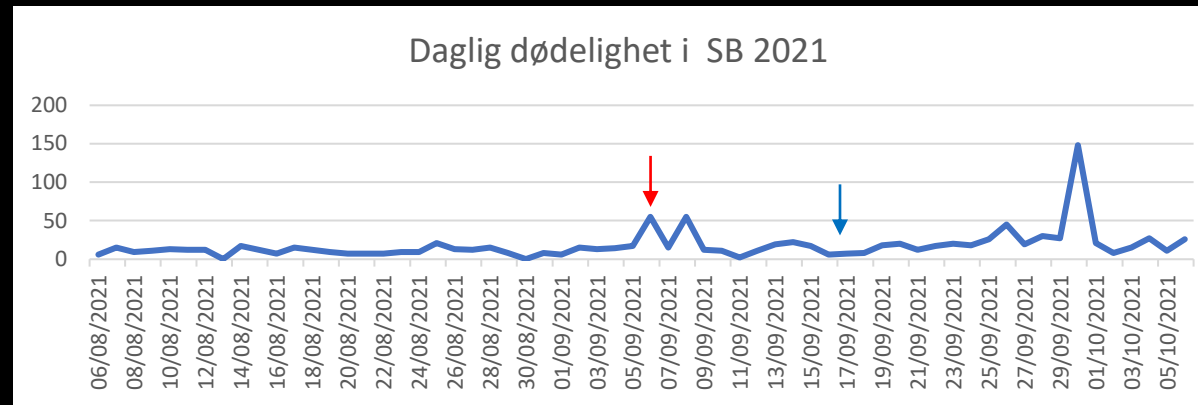
Tre termiske behandlinger av laks hold i kjølt ferskvann

Lokalitet	før	død	etter
SB2021	06.09.2021	08.09.2021	17.09.2021
Dag	-2	0	9
N	30	30	30
GB2022	08.06.2022	09.06.2022	20.06.2022
Dag	-1	0	11
N	30	30	32
LB2022	24.08.2022	24.08.2022	08.09.2022
Dag	0	0	17
N	30	30	31

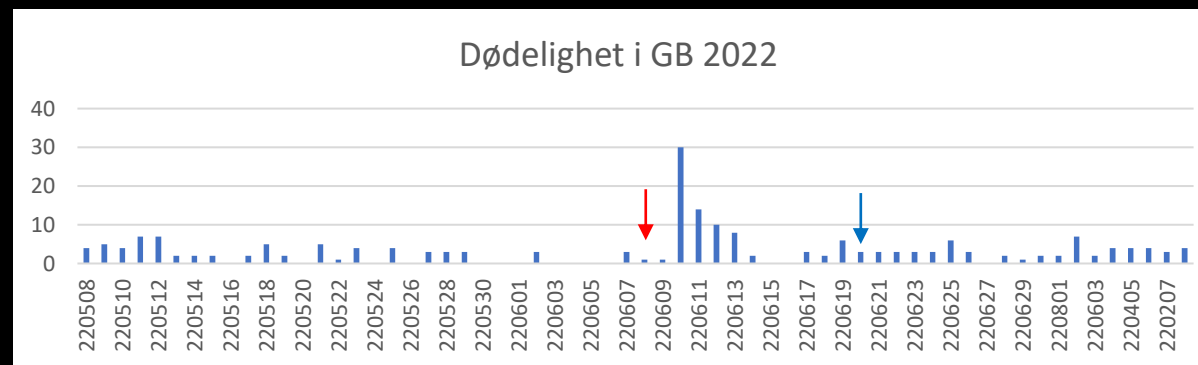
Lokalitet	Kjørt ferskvann	Termisk behandling	$\Delta = ^\circ\text{C}$
SB2021	8 $^\circ\text{C}$ / 4 timer	30 $^\circ\text{C}$ / 30 sek	22
GB2022	8,5 $^\circ\text{C}$ / 4 timer	30,5 $^\circ\text{C}$ / 30sek	22
LB2022	6 $^\circ\text{C}$ / 4 timer	28 $^\circ\text{C}$ / 30 sek	22

Lokalitet	Dødelighet før	Dødelighet	Dødelighet etter
SB2021	0,02 %	0,08 %	0,01 %
GB2022	0,002 %	0,01 %	0,003 %
LB2022	0,02 %	0,08 %	0,01 %

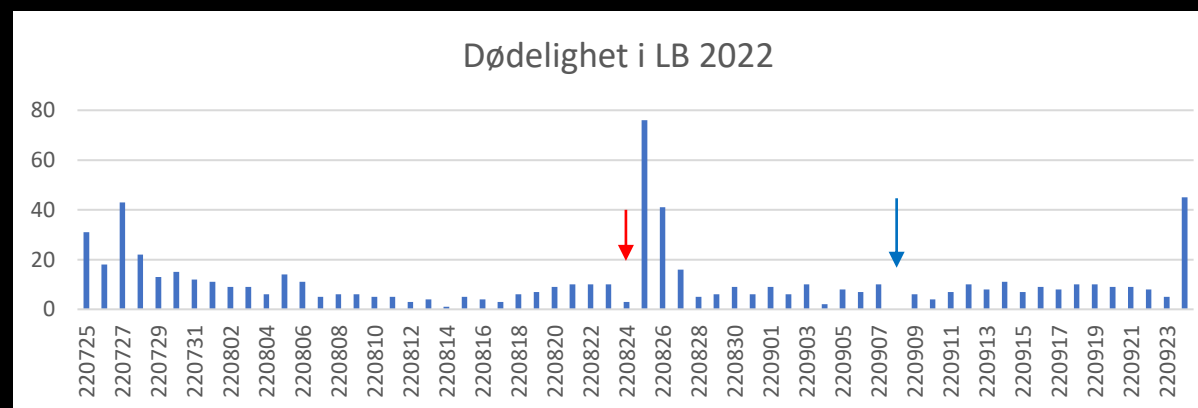
NB: Laksen begynte å spise kort tid etter at den var tilbakeført til merden etter termisk behandling i alle tre anleggene.



Høst avlusing
Temp = 13,8 $^\circ\text{C}$
Lus: 3,5 – 0,3

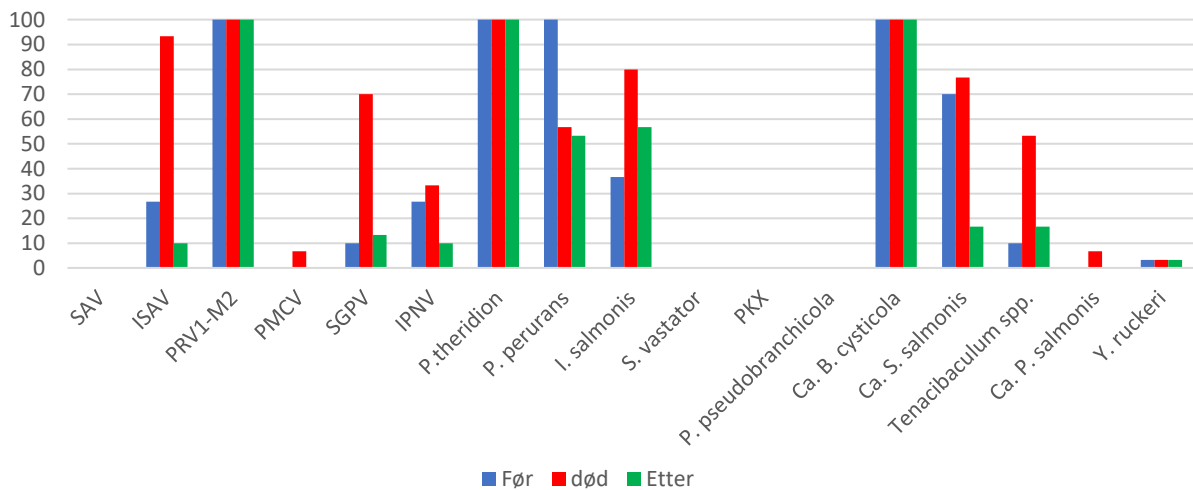


Vår avlusing
Temp = 9,1 $^\circ\text{C}$
Lus: 3,7 – 0,28

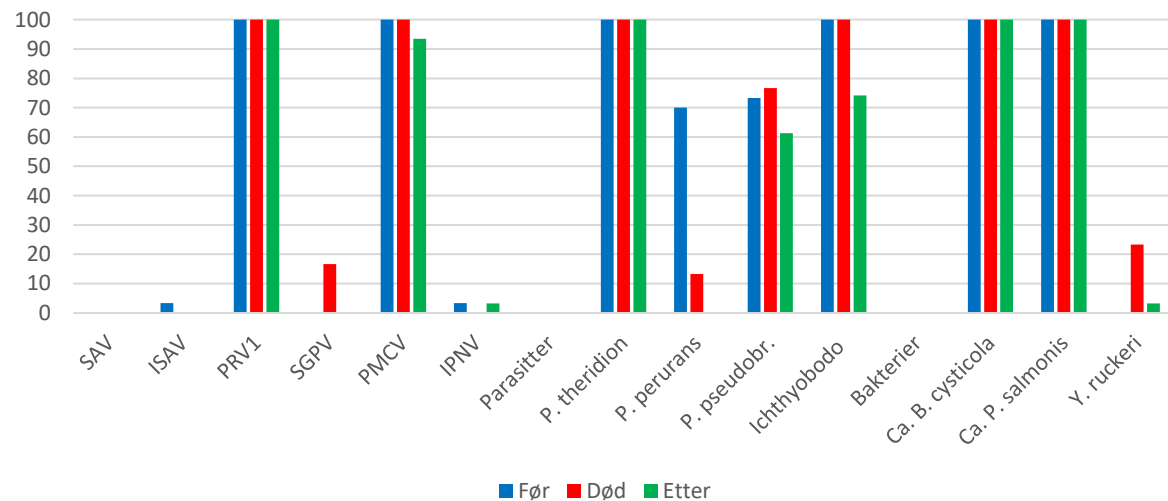


Sommer avlusing
Temp = 15,8 $^\circ\text{C}$
Lus: 2,3 – 0,15

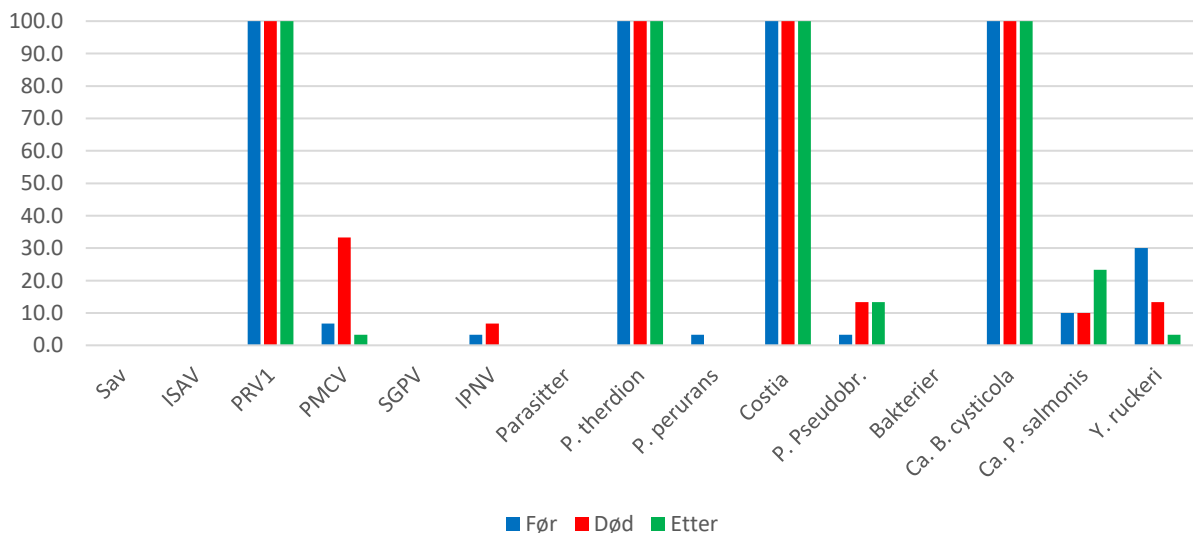
Prevalens i SB



Prevalens i LB



Prevalens i GB



NB: Det ble ikke observert forskjeller i belastning (tetthet) før og etter behandling med unntak av reduksjon av *P. perurans* i GB og *Ichthyobodo salmonis* i LB.

I anlegg SB ble PMCV og Ca. *P. salmonis* kun påvist hos død laks, men med lav prevalens og tetthet. I tillegg var prevalens og SGPV og ILAV (HPO) høyere hos død laks.

Konklusjon: termisk behandling av laks fra kjølt ferskvann

- Termisk behandling gav en signifikant reduksjon i mengde lakselus på fisken i alle tre anleggene.
- Tap av fisk i forbindelse med behandlingen var minimal (0,01 – 0.08 %).
- Behandlingen hadde ikke noen klar negativ innvirkning på gjellehelsen.
- Ingen ytre skader ble observert etter behandling.
- Fisken begynte å spise innen et døgn etter behandling.

Termisk behandling - anbefaling

Den mest skånsomme termiske behandlingen synes å være behandling av laks som ha vært hold i kjølt ferskvann i fire timer før behandling.

(Dette gir også mulighet til å oppnå en optimal delta uten å gå høyere i temperatur enn 30 °C.)

Høy belastning med PMCV, PRV, SAV, *P. theridion*, *P. perurans* og *Cand. B. cysticola* er assosiert med økt dødelighet ved termisk behandling.

Det må foretas en nøye vurdering av gjellehelse og hjertepatologi før termisk behandling av laksefisk.

Termisk behandling om våren, med lav belastning fra gjellepatogener, gir mindre risiko for dødelighet enn tilsvarende behandling om høsten.

Hva må prioriteres? Ny kunnskap for bedre gjellehelse.

- Videre utvikling av metoder for mekanisk avlusing.
- Nye metoder for kjemisk avlusing.

- Økt kunnskap om de antatt mest alvorlige gjellepatogener.
- Er alle gjellepatogener hos laks i norsk oppdrett identifisert?

- Hvilke miljøfaktorer, i tillegg til temperatur, og andre patogener er viktig for utvikling av gjellesykdom hos laks?

- Endringer i produksjon av laks i områder med alvorlig gjelleproblemer?