

Nefrodiagnostikk i NephroReduce:

Hva finner vi og hvordan?



Kirsti Hjelde

Forsker /veterinær Nofima

Elisabeth Faureng og Anette Nordby

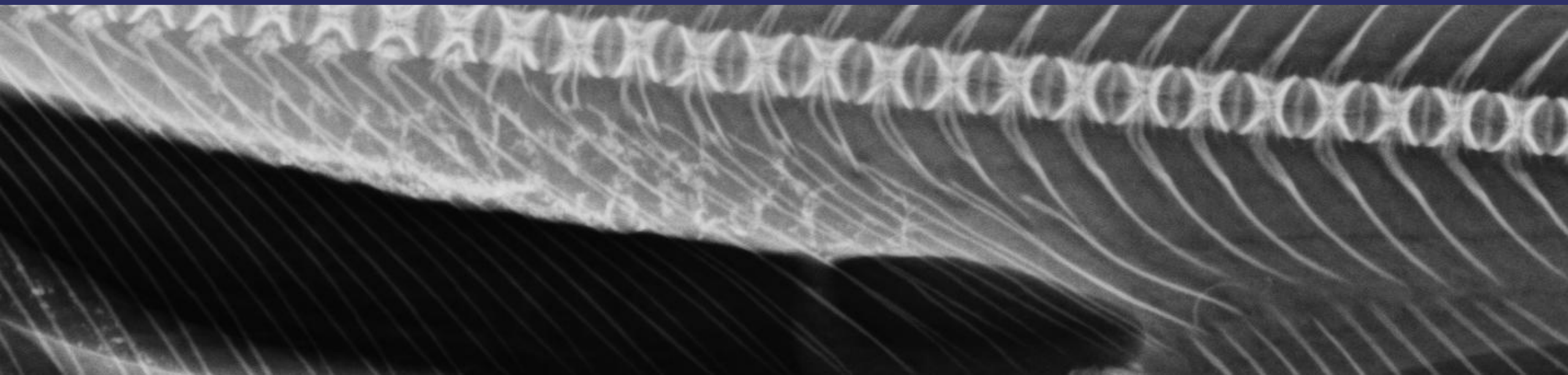
Veterinærer PatoGen



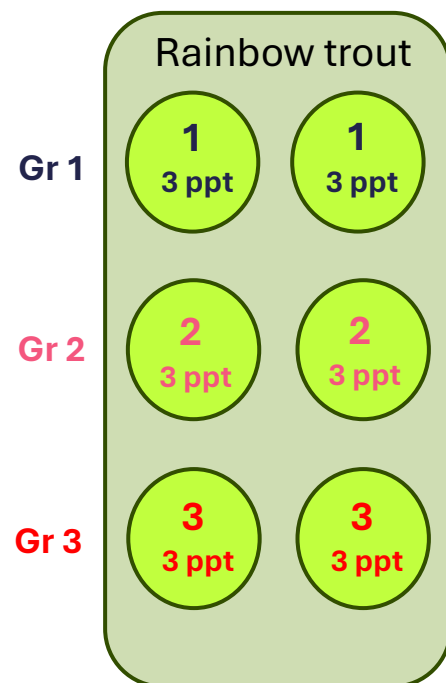
NephroReduce –forsøk på Sunndalsøra

Et todelt forsøk (laks og ørret) i singelRAS med kontrollerte økninger og dropp av CO₂ og O₂. Hovedproblemstilling er å undersøke fysiologien bak og diagnostikken ved utvikling av nefrokalsinose.

Delt i to påfølgende forsøk med ørret først i stedet for parallelle forsøk for å minske risiko og kunne samle erfaring til lakseforsøket.



Seks singelRAS-systemer med ferskvann (3ppt)



Pittaget og
røntgenundersøkt
fisk inn i systemet



- Gr 1:** Stabil på CO₂ 5 mg/l (basalnivå) og O₂ på 95 %
Gr 2: Jevn økning i CO₂ fra 5-35 mg/l og O₂ stabil på 95 %
Gr 3: Jevn økning i CO₂ fra 5-35 mg/l og O₂-økning fra 95% til 120 %

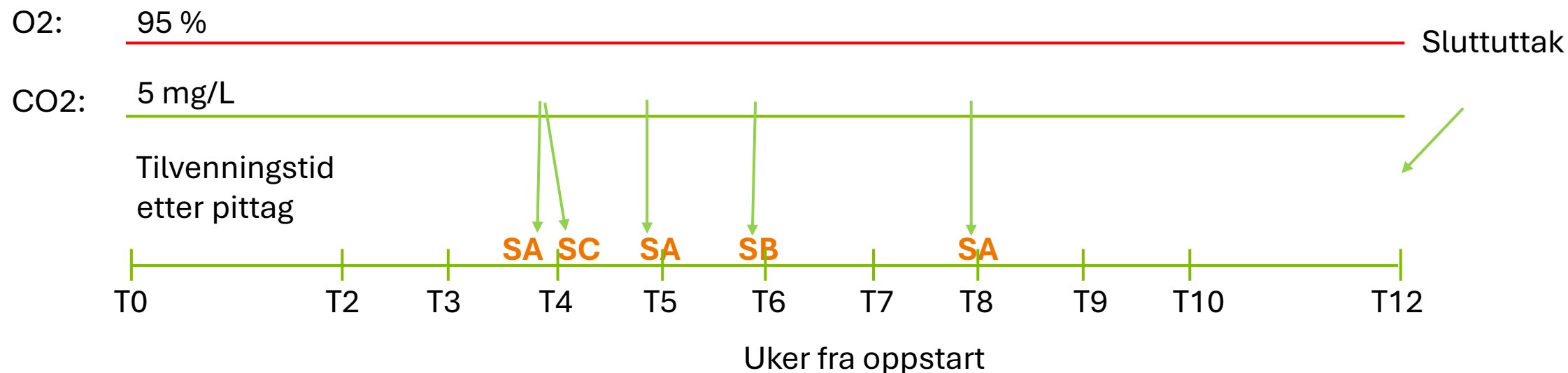
Tidslinje gruppe 1

Ørret: Startvekt 20 gram, sluttvekt 240 gram

Sampling A: 5 fisk per tank til røntgen, histologi, blod, urin og vev.

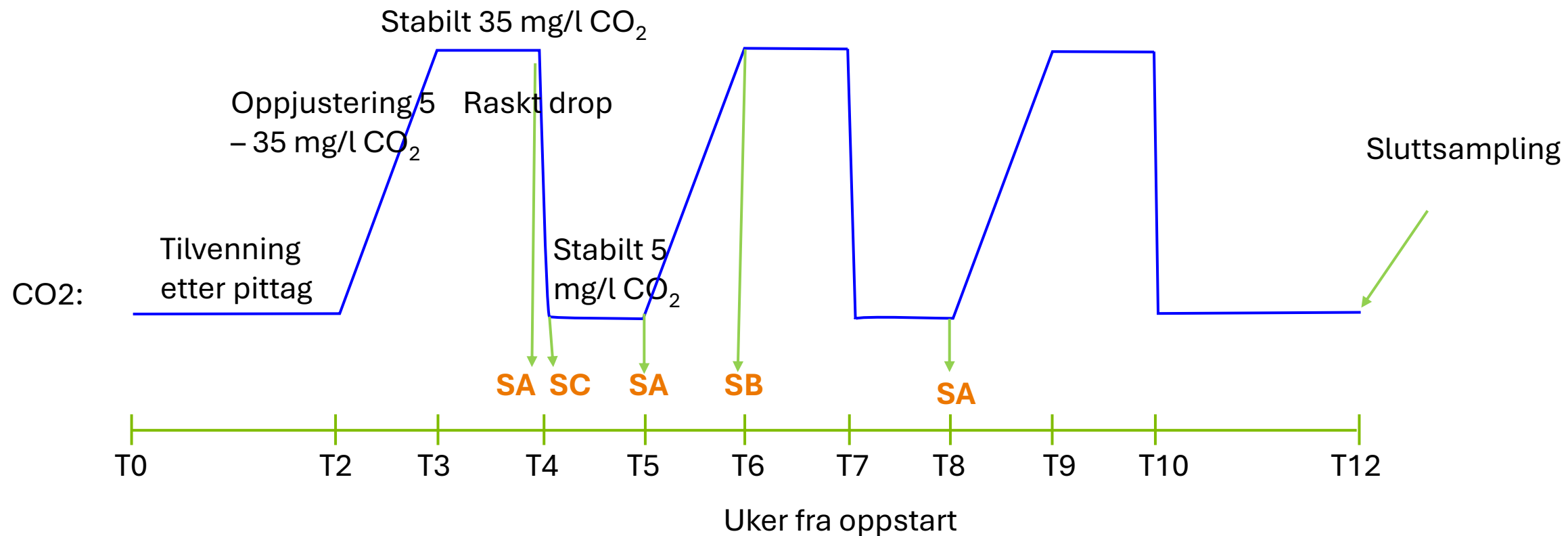
Sampling B: Levende røntgen av 25% av fisken satt tilbake i tank. I tillegg 5 til røntgen, histologi, blod, urin og vev.

Sampling C: 5 fisk per tank til histologi, blod, urin og vev.

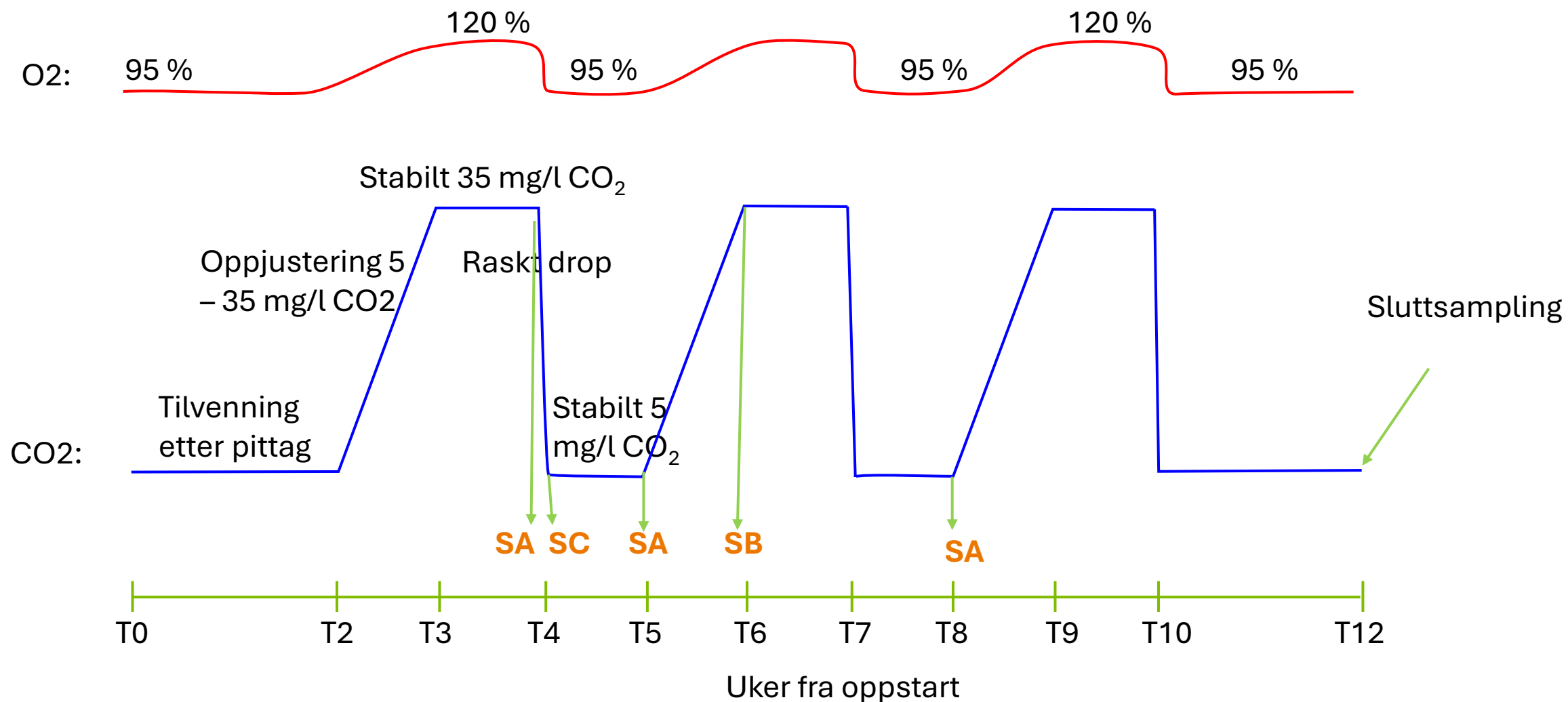


Tidslinje gruppe 2

O₂: 95 %



Tidslinje gruppe 3



Diagnostiske metoder

- Makroscoring ved åpning av all prøvefisk og vurdering av nyrets overflate, foto av mange. NB: 'forekomstbias!'
- Røntgenbilde av all fisk levende inn i forsøket, 25% levende ved halvgått forsøksløp og all fisk ved avslutning pluss all prøvefisk underveis.
- Histologi av et utvalg fisk på flere punkter, dels styrt
- Røntgen og macroscoring etter 0-4 score utviklet under CTRLAqua, verifisert ved histologi.



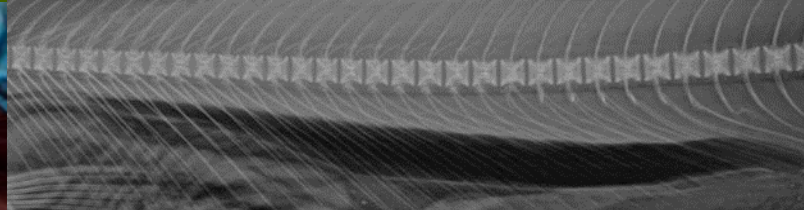
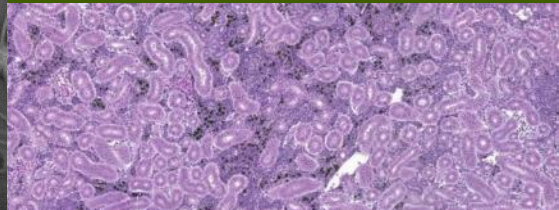
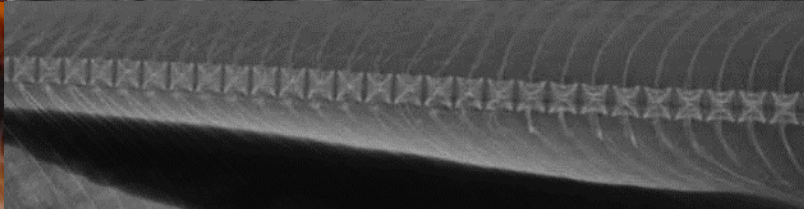
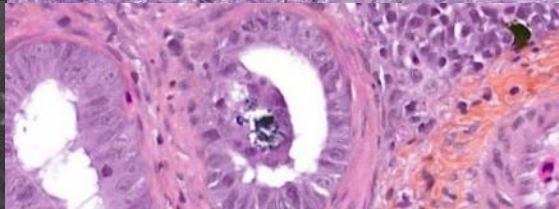
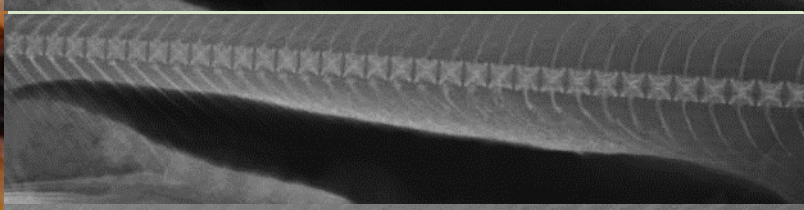
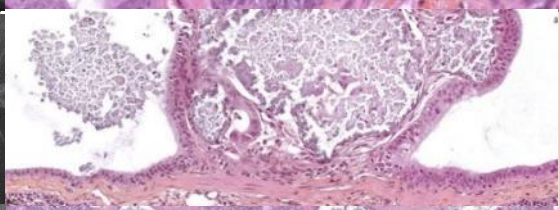
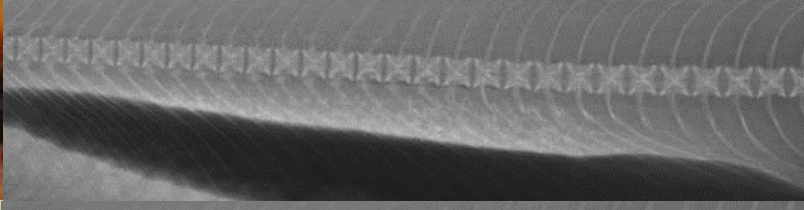
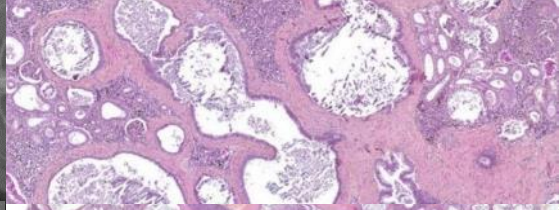
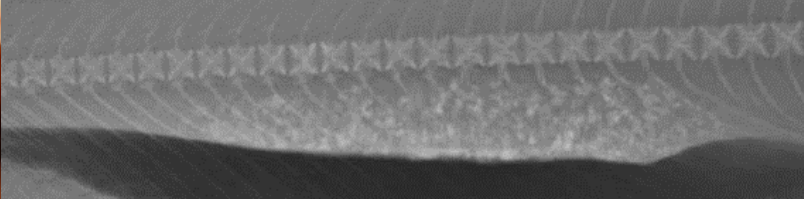
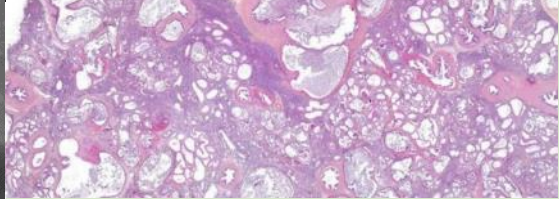
Diagnostiske tester:

De to sentrale egenskapene til en diagnostisk test er sensitivitet og spesifisitet.

Sensitiviteten er sannsynligheten for at en syk pasient får riktig svar, dvs. positiv test.

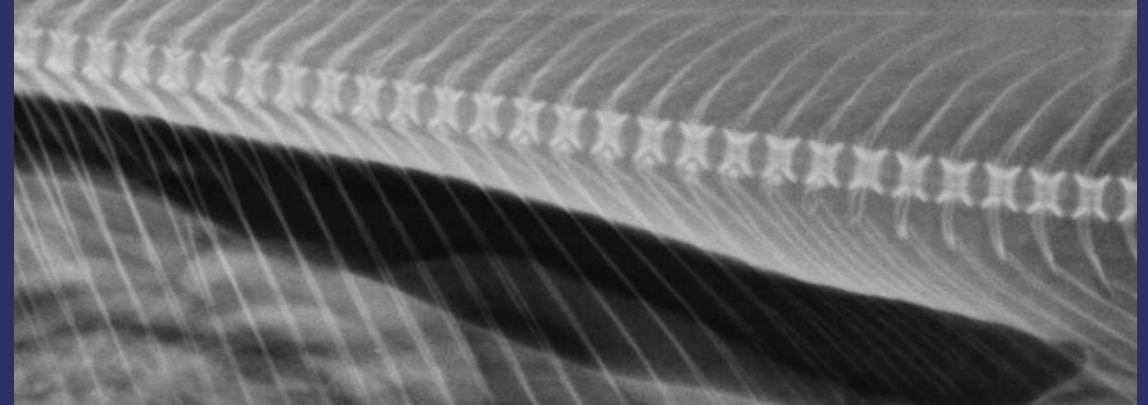
Spesifisiteten er sannsynligheten for at en frisk pasient får riktig svar, dvs. negativ test.

- Nefrokalsinose er per definisjon forkalkninger i nyrevev
- Velger å bruke røntgenscore > 1 som verifisert nefrokalsinose for å sikre mot usikker diagnostisering
- Har grad 1 ingen klinisk betydning? Men vi er jo akademikere og jakter årsak...

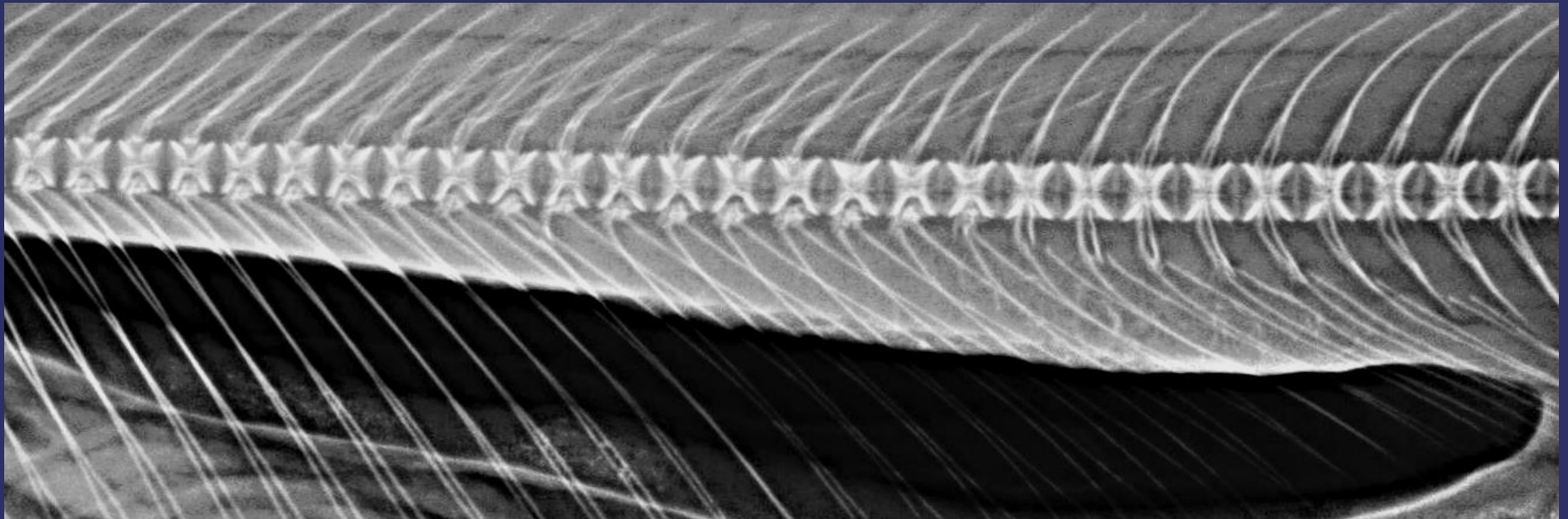
Score	Macro	X-ray	Histology example
0			
1			
2			
3			
4			

Utvikling av første nefrokalsinose på ørret

Oppstart forsøk 27.05.24: NC 0



80g, høy CO₂/O₂ før drop, 27.06.24: NC2



Nefrokalsinosefunn på røntgen ørret sluttuttak:

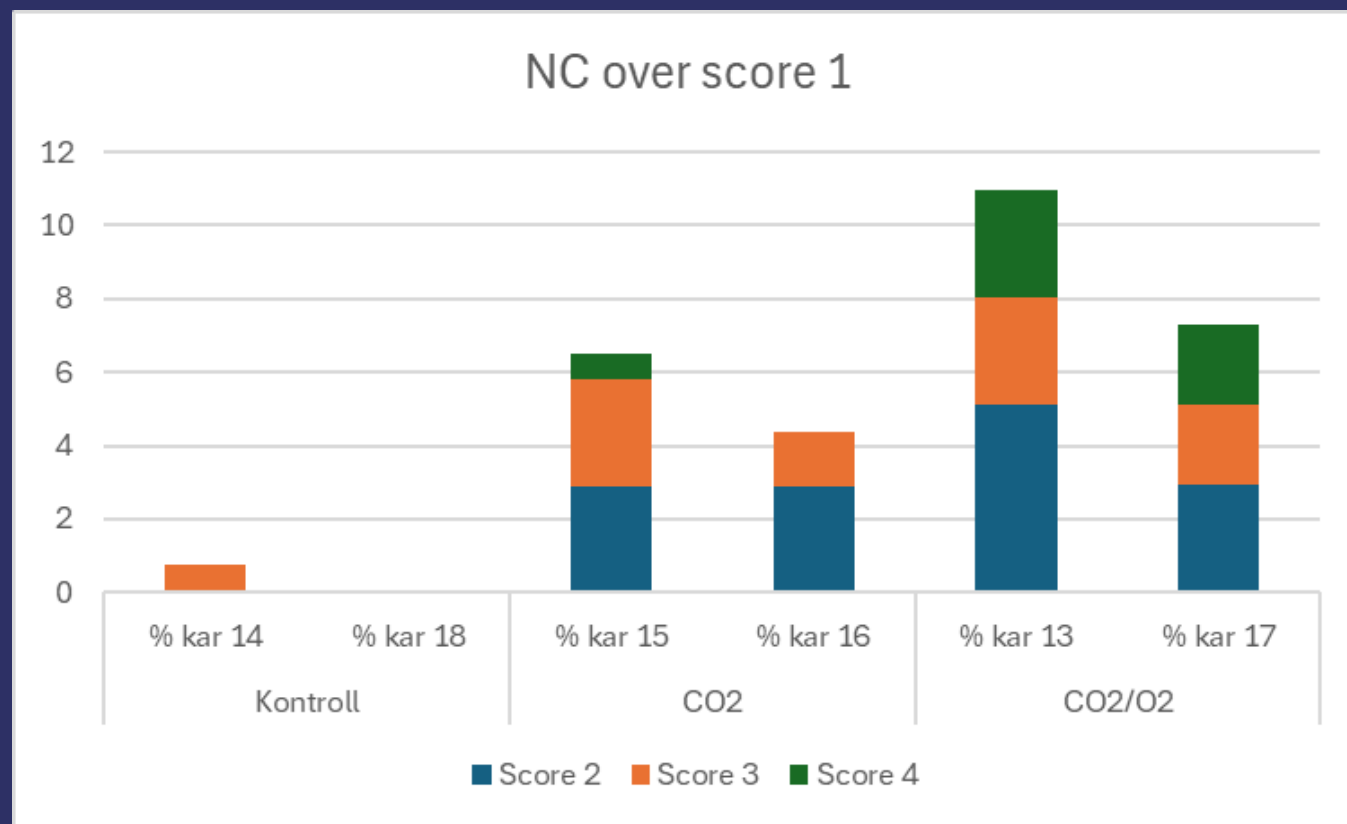
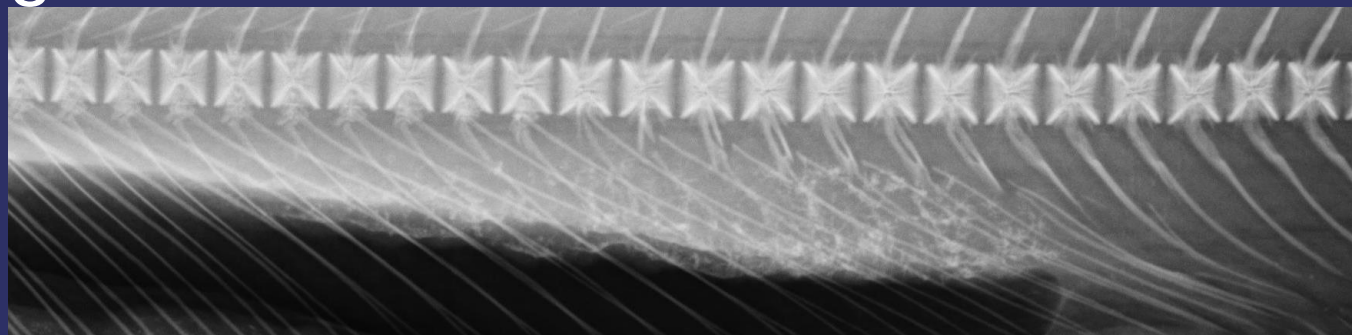
Moderat innslag av NC: 40 fisk av 818 = 4,9%

Kontrollgruppa: 1 fisk av 269 (0,4%)

CO² -gruppa: 15 fisk av 275 (5,5%)

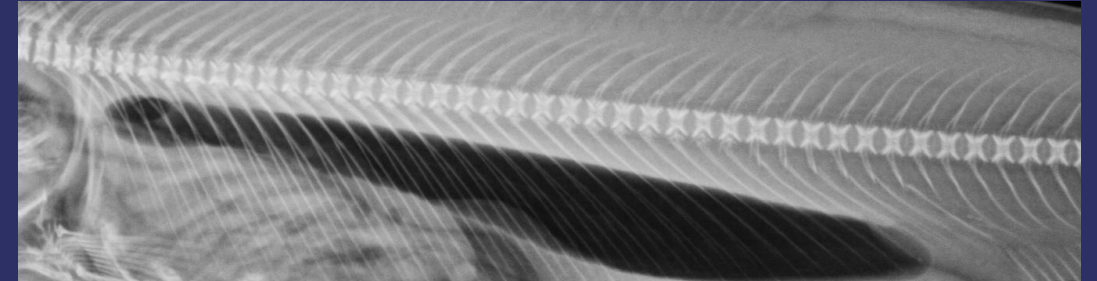
CO² og O²: 24 fisk av 274 (8,7%)

Samme bilde over alle samplinger, økende alvorlighet og forekomst med økende CO₂ og O₂.

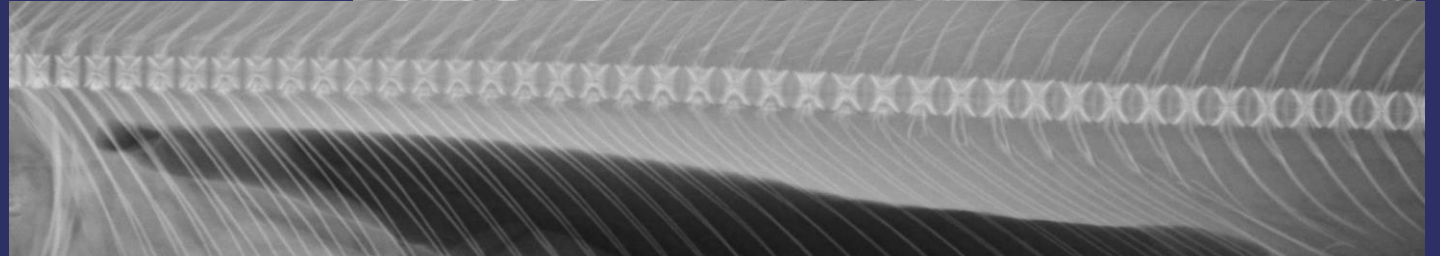


Utvikling av lavgradig nefrokalsinose på ørret -samme fisk tre ganger

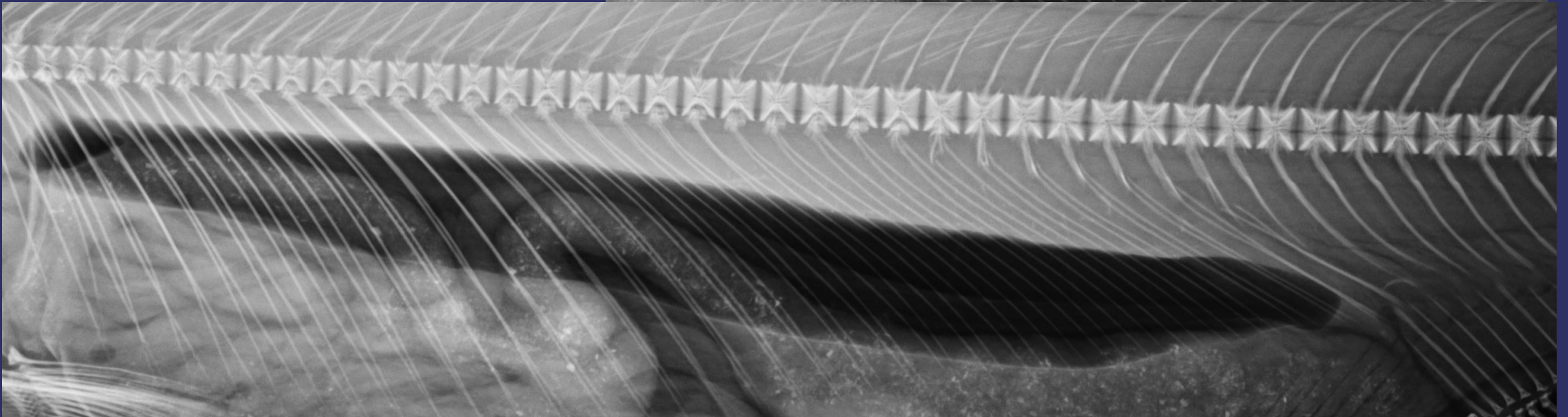
Oppstart 27.05.24 NC0



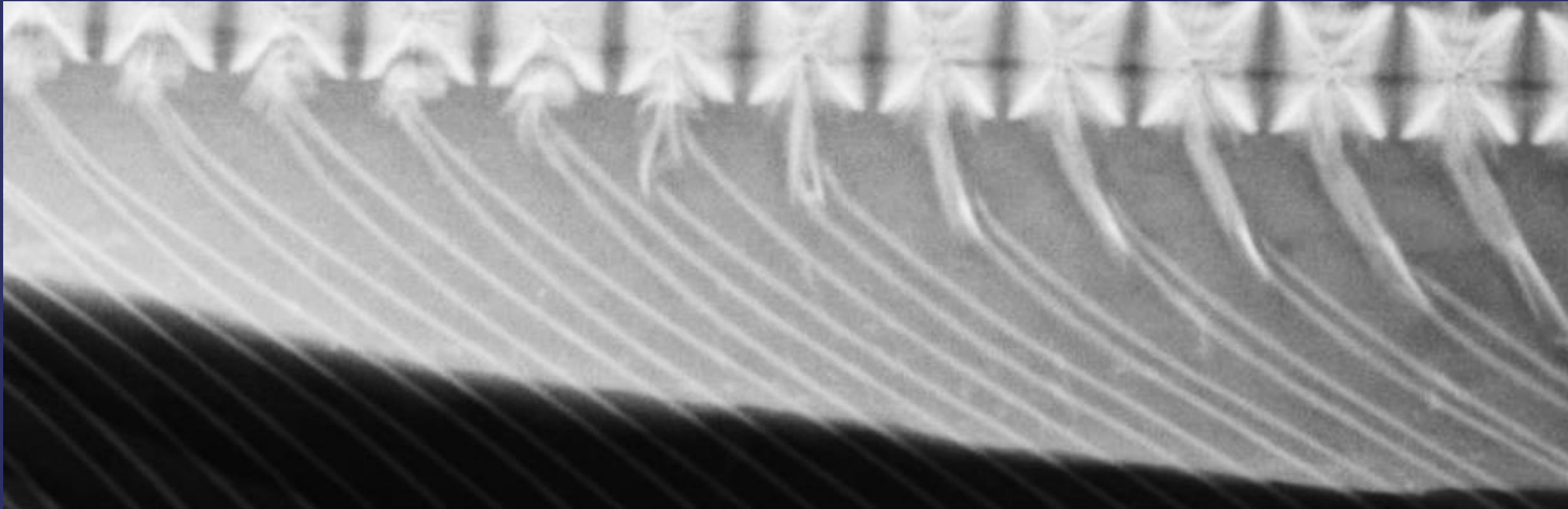
Mellomuttak 24.07.24 NC0



Avslutning 22.08.24 NC2

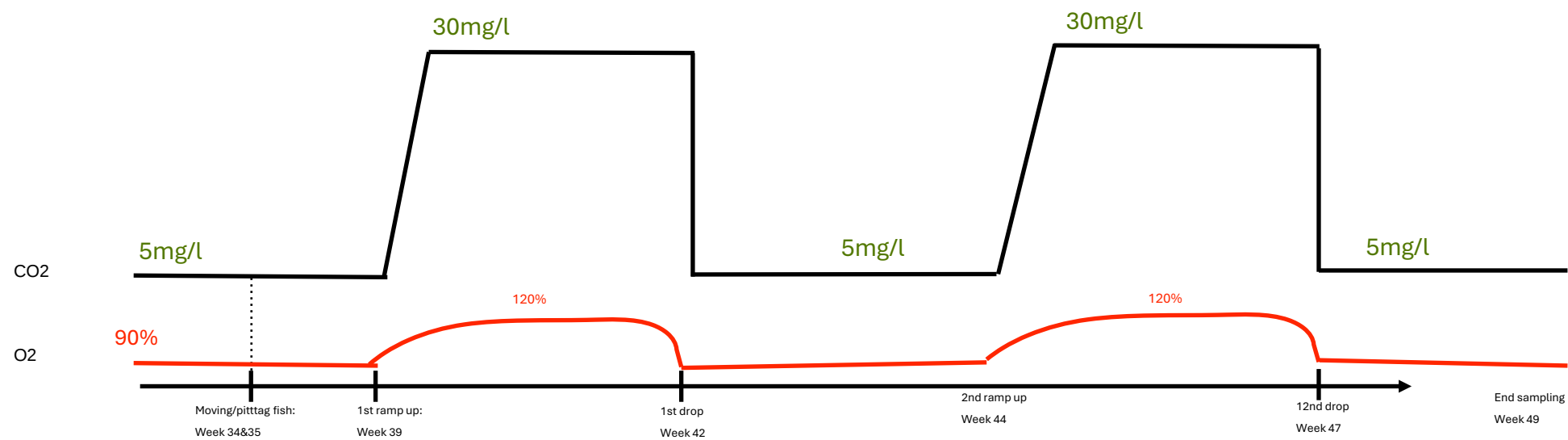


Forstørrelse av bilde fra sluttuttak pga dårlig erfaring med storskjerm.



Laks: ny art, nye muligheter!

Nytt oppsett på gruppe 2 og 3 pga forventet mer NC ved lenger tids CO₂ -eksponering



Nefrokalsinosefunn på røntgen laks sluttuttak:

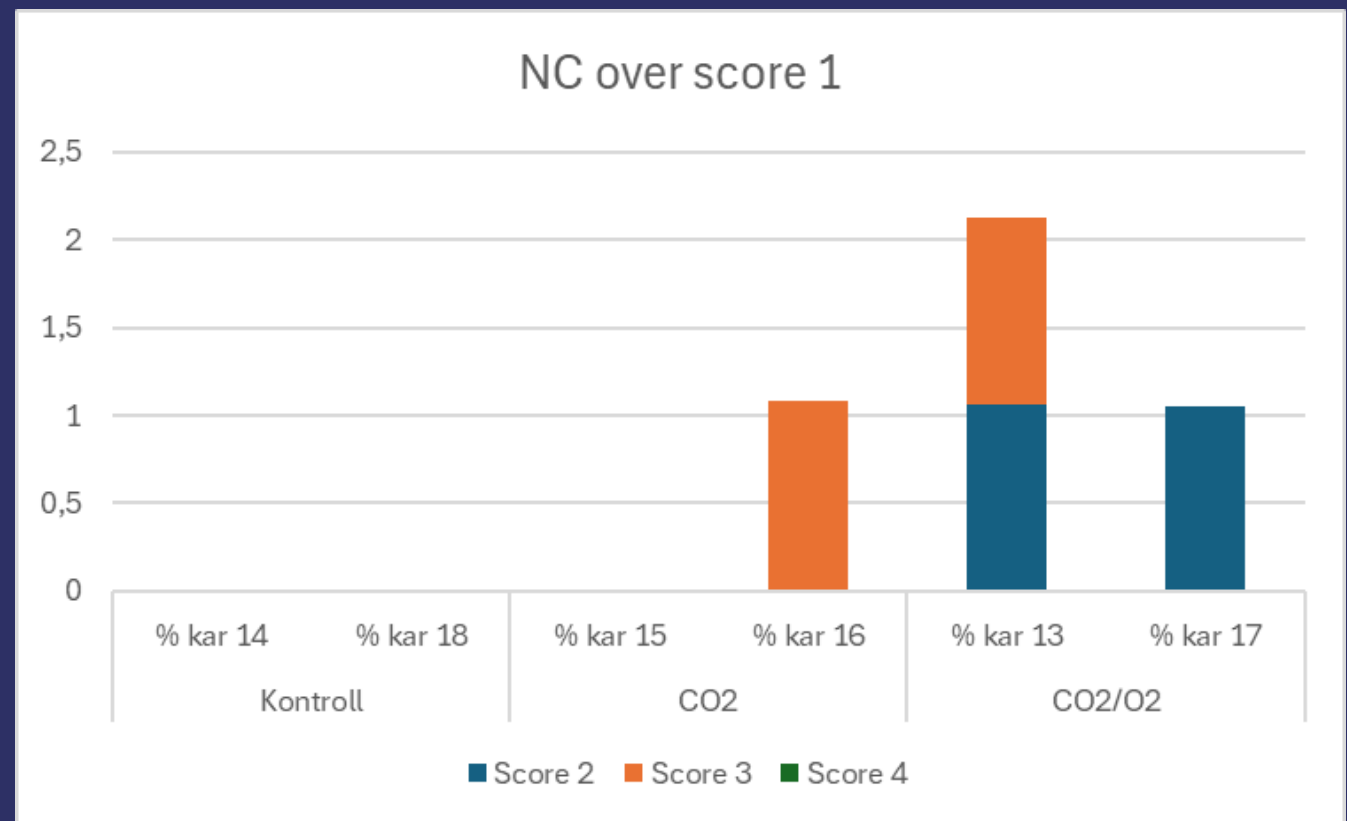
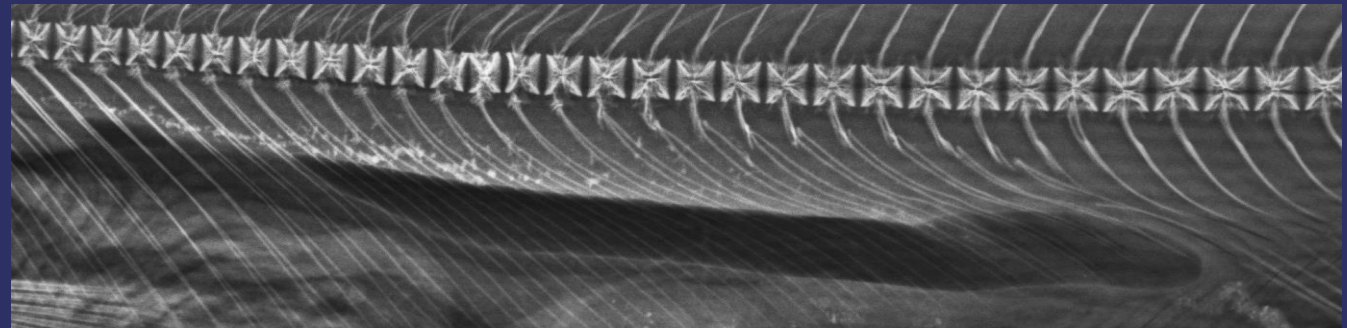
Lite NC observert: 4 fisk av 569= 0,7%
Pga høyere inngangsvekt (40g)? Færre drop?

Kontrollgruppa: 0 fisk av 190 (0%)

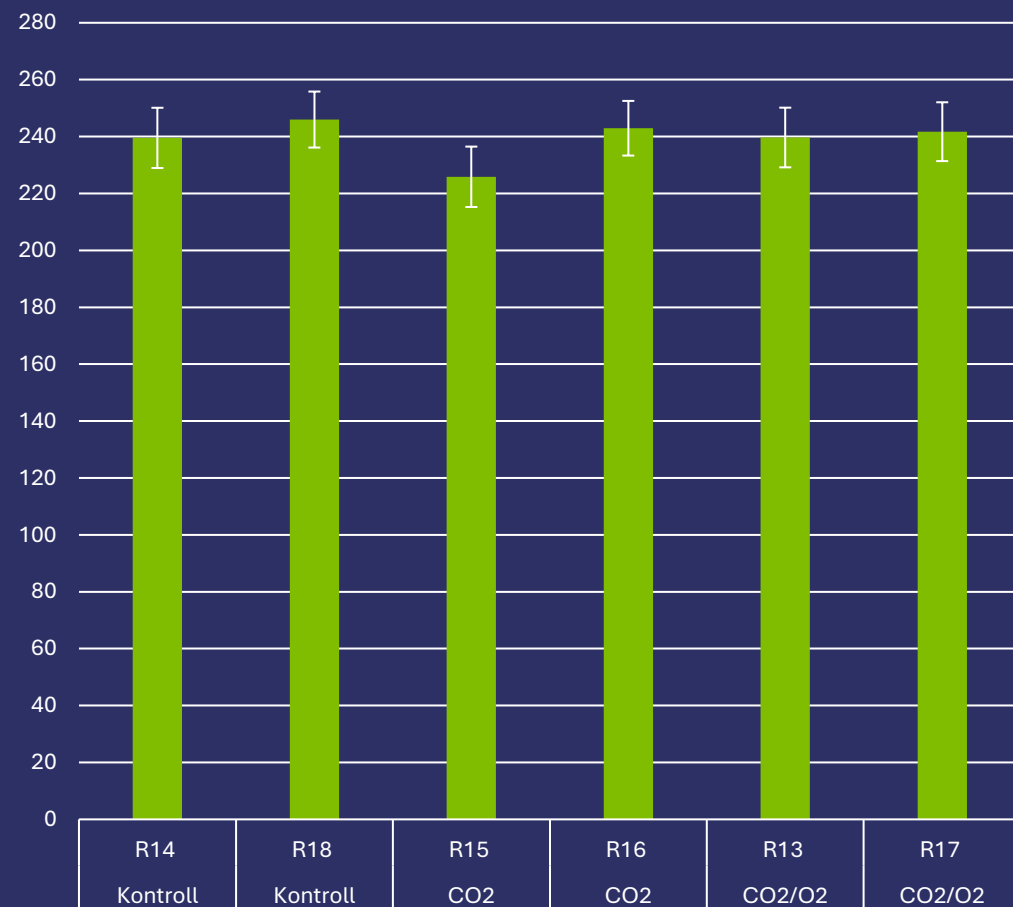
CO² -gruppa: 1 fisk av 190 (0,5%)

CO² og O²: 3 fisk av 189 (1,6%)

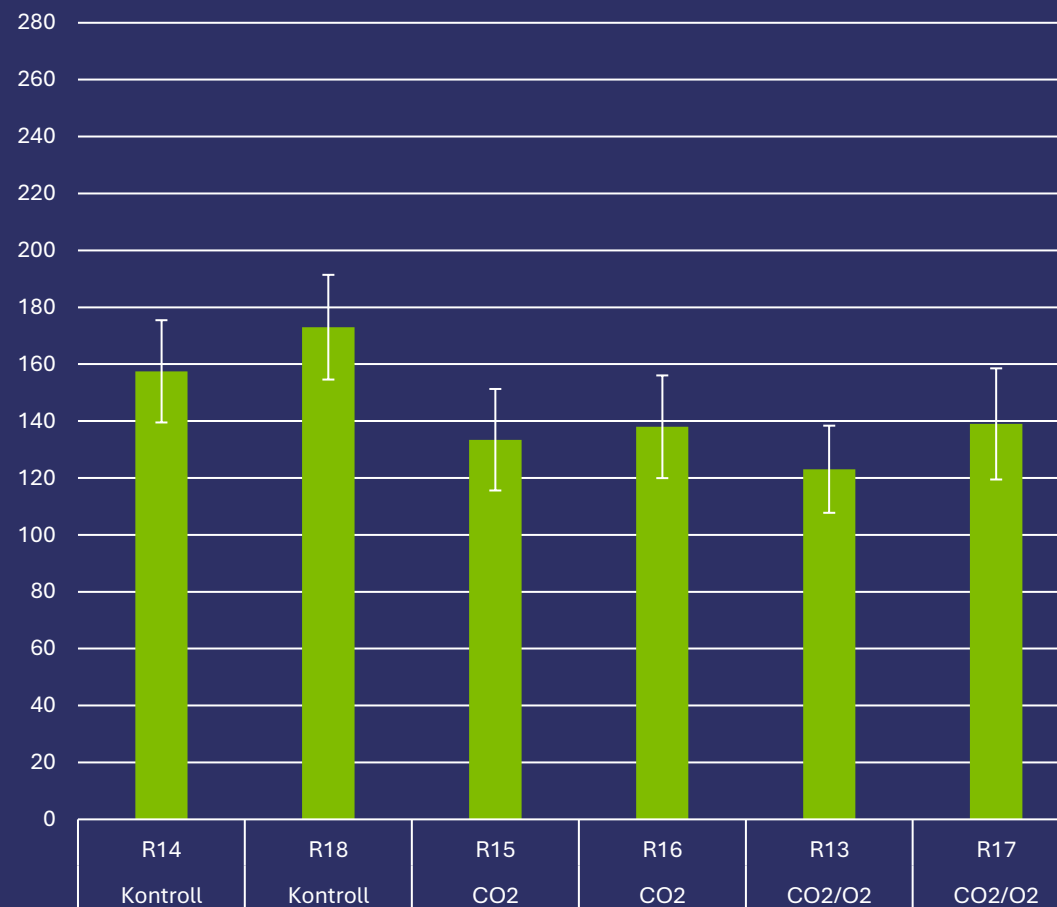
Stort sett samme bilde over alle samplinger.
Lave antall, men økende alvorlighetsgrad og forekomst med økende CO₂ og O₂.



Sluttvekt ørret (start 20g)



Sluttvekt laks (start 40g)



Til tross for halve størrelsen ved start og flere individer i karene vokser ørreten mye bedre, og tilsynelatende upåvirket av CO2-nivåene.

According to the mammalian terminology, **nephrocalcinosis** is characterized by calcium (Ca^{2+}) oxalate or phosphate deposits in the kidney tissues itself, while **nephrolithiasis** (kidney stones) are crystal concretions formed mainly of calcium, magnesium (Mg^{2+}) and phosphate in the excretory tubules, ureter and urinary bladder (Wong, 2005). In the fish literature few make this distinction and mostly use the term **nephrocalcinosis** independent of whether the salt deposits are located in the kidney tissue itself or in the excretory tubules and ureter, resulting in tubule dilation, degeneration and destruction of tissue (Smart *et al.*, 1979; Gillespie and Evans, 1979; Klykken *et al.*, 2022).



Kartlegge og beskrive NK diagnostiske funn slik at de blir mer feltanvendelige, og forståelige.

Hva betyr egentlig det vi finner?

Hvorfor?

- Det er store variasjoner i det vi observerer i felt:
 - Når det oppstår i produksjonen
 - Hvordan det utvikler seg,
 - Hvordan det påvirker generasjonen
 - Hvordan klinisk bildet og obduksjonsfunn er
 - Histologiske vurderinger er og har vært
 - Status sjø

PatoGen- arbeidspakke 3

Vi vil vurdere om det er riktig å klassifisere nefrokalsinose som én diagnostisk kategori, eller om diagnosen bør deles inn i underkategorier (presipitering, grad av skade, hvor skade starter)



Betyr dette at nefrokalsinose består av flere undergrupper med:

- Ulike årsakssammenhenger
- Forskjellig påvirkning på fiskehelse
- Varierende prognose og egenskaper?

Hvis ja:

- Må vi identifisere disse variantene for å kunne iverksette riktige tiltak

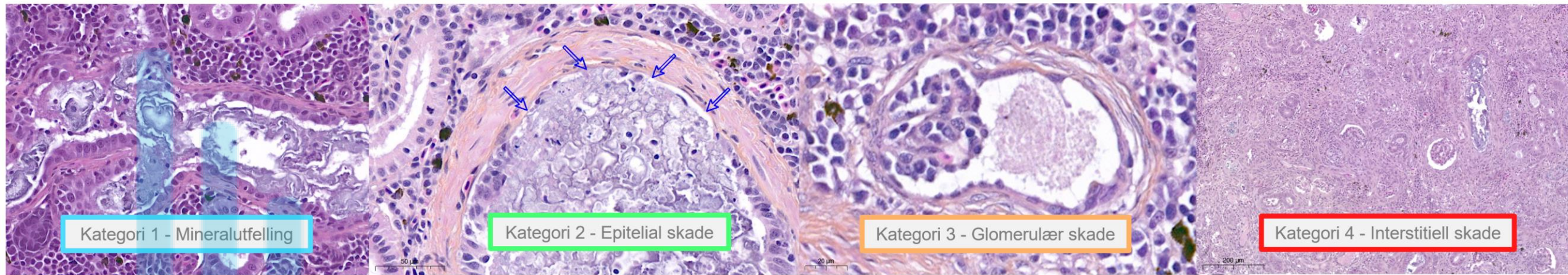
Hvorfor?

- Det er store variasjoner i det vi observerer i felt:
 - Når det oppstår i produksjonen
 - Hvordan det utvikler seg,
 - Hvordan det påvirker generasjonen
 - Hvordan klinisk bildet og obduksjonsfunn er
 - Histologiske vurderinger er og har vært
 - Status sjø

Status:

- Dette jobber vi med

Histologi ved nefrokalsinose - forandringer og vurdering



Nyret har flere vev og flere **VIKTIGE** funksjoner som kan skades eller gå tapt ved nefrokalsinose:

Ekskretorisk vev (nefronet):

- Filtrerer ut avfallsstoffer
- Regulerer syre-base-balansen
- Osmoregulerer



Bloddannende vev:

- Produserer røde blodceller viktig for oksygentransport
- Produserer hvite blodceller og er lymfoid organ, viktig for immunforsvaret

Hormonproduserende vev:

- Viktig for regulering av blodtrykk, væskebalanse og produksjon av blodceller.

Hvilke skader kan nefrokalsinose gi?

- Skade på vev i kategori 2, 3 og/eller 4:
 - Epitelet i tubuli og samlerør
 - Glomeruli
 - Interstitium
- Smerte

1 - Mineralutfelling

- Redusert evne til filtrering
- Opphopning av avfallsstoffer og væske i kroppen

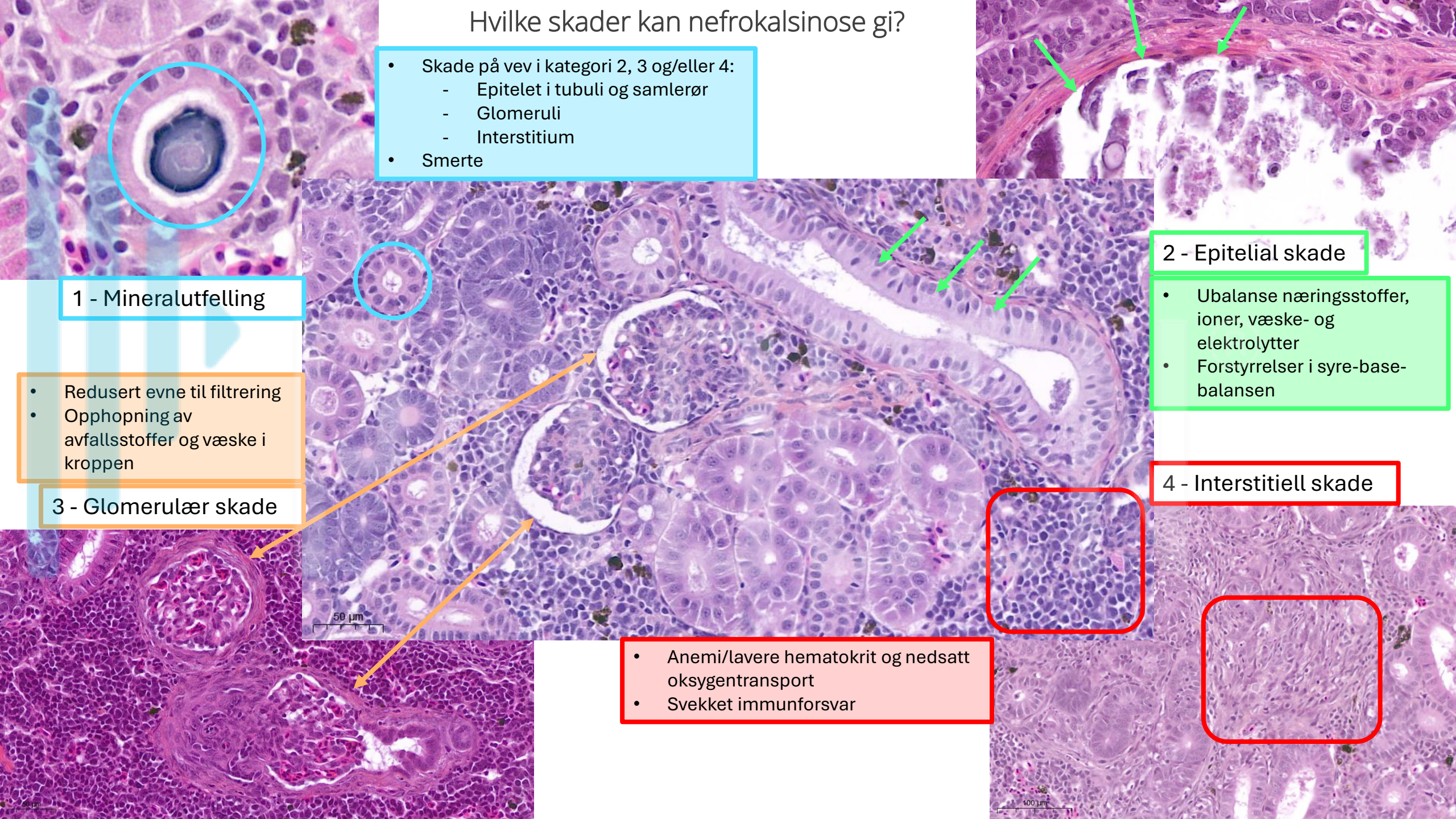
3 - Glomerulær skade

2 - Epitelial skade

- Ubalanse næringsstoffer, ioner, væske- og elektrolytter
- Forstyrrelser i syre-base-balansen

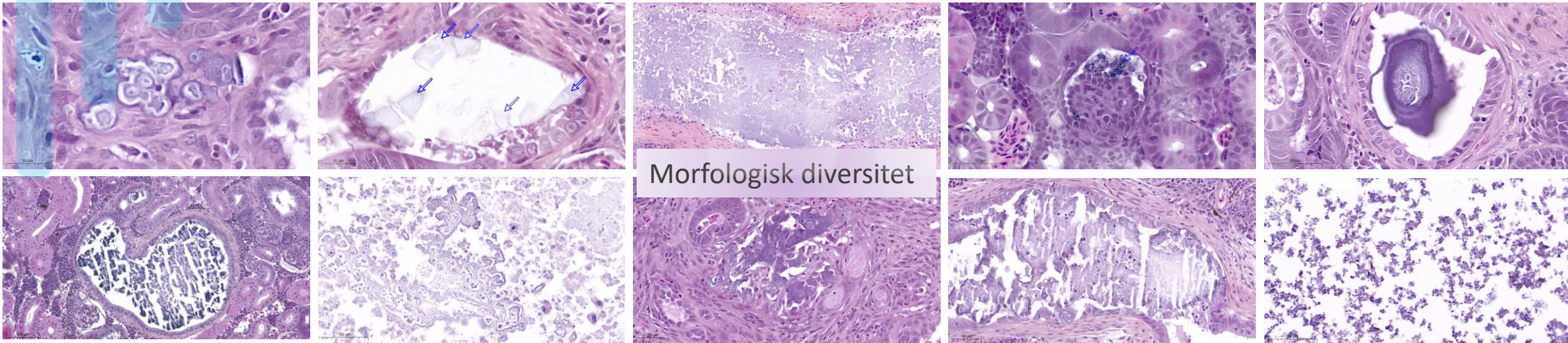
4 - Interstitiell skade

- Anemi/lavere hematokrit og nedsatt oksygentransport
- Svekket immunforsvar



Histologiske funn i forsøket, NephroReduce

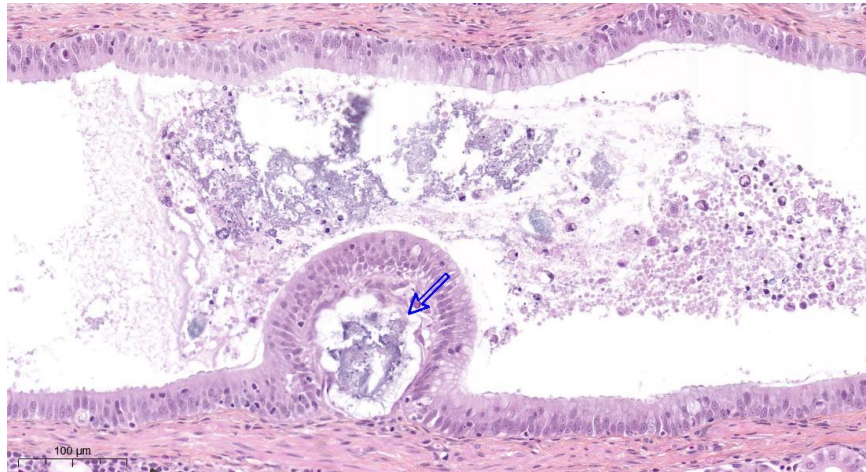
- Lav prevalens av nefrokalsinose for både ørret og laks
- Varierte funn:
 - Minimale til uttalte forandringer
 - Akutte og kroniske forandringer
 - Mineralutfellinger fra glomeruli til urinblære, samt interstitielt
 - Morfologisk diversitet på utfellinger



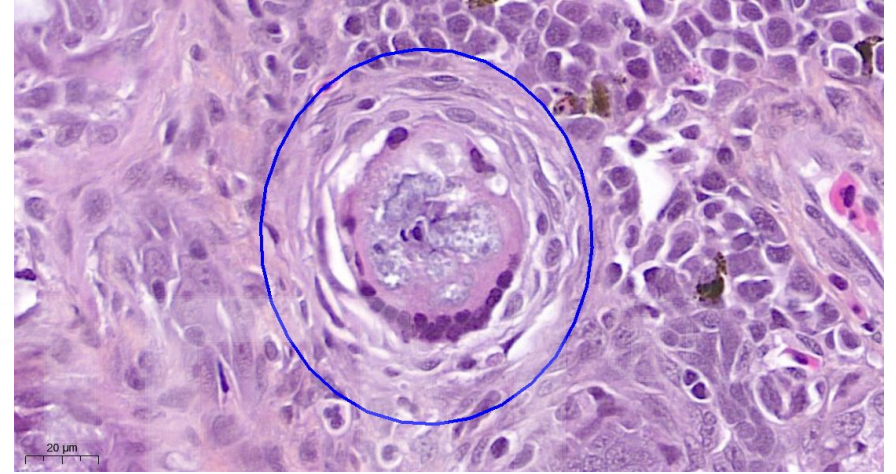
Bildene er eksempler fra ørret.

Ørret vs laks i forsøket, NephroReduce

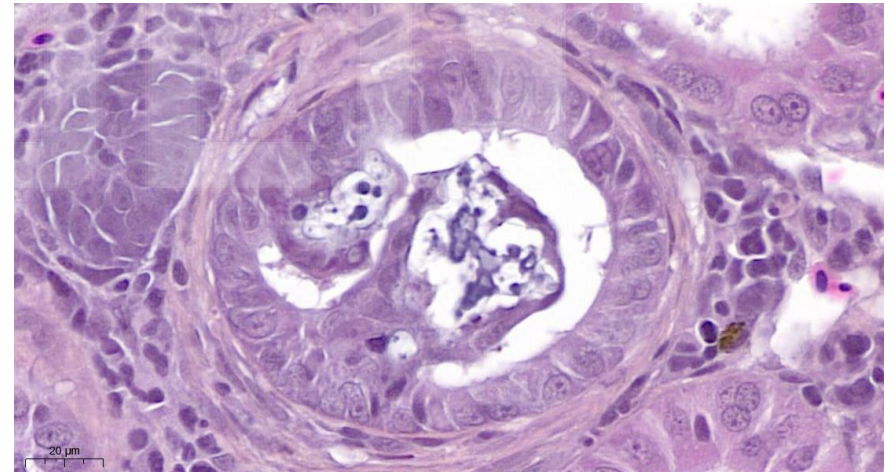
- Lav prevalens i forsøket på laks
- Stor grad av kroniske forandringer hos ørret
- Varierende subkapsulær betennelse hos ørret
- Større grad av flerkjernede kjempeceller hos ørret
- Ingen store forskjeller i,
 - Anatomisk lokalisasjon av utfellinger
 - Nukleeringssted utfellinger
 - Morfologi utfellinger



Basofilt konkrement under epitelet i urinleder. Laks.



Basofilt konkrement i flerkjernet kjempecelle. Ørret.



Basofilt konkrement i epitelet i samlerør. Ørret.

Hva har vi gjort



Startet med å definere diagnosen og se på kategorisering

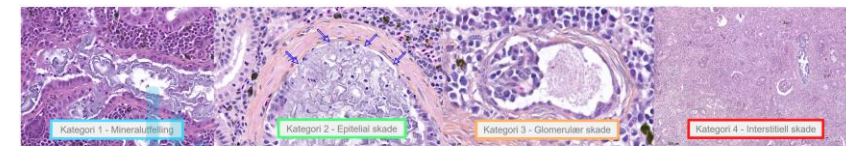
- Funn er variable
 - **Ikke et nederlag.**
 - Forteller oss at NK er komplekst, og vi må se på mer materiale, fra felt og forsøk. Fortsette arbeidet.

Jobbe videre med:

- Videreutvikling av nefrokalsinose score
- Sammenstilling av diagnostiske funn (makro, røntgen, histologi og fysiologi)
- Det er viktig at vi bruker tid på dette fremover for å kunne forstå hva som karakteriserer denne diagnosen, og hvordan den påvirker fisken vår.

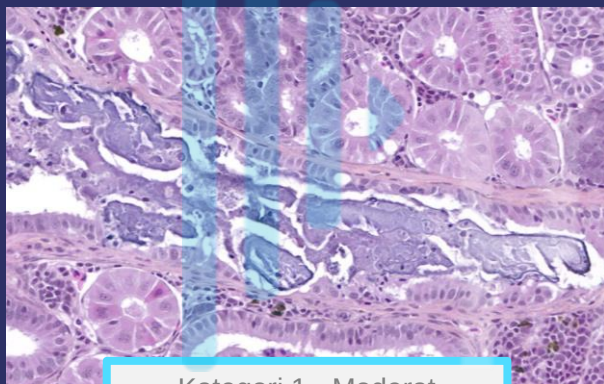
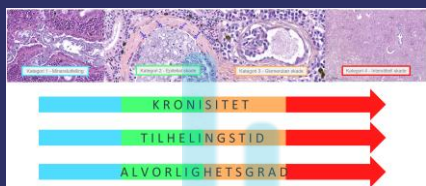
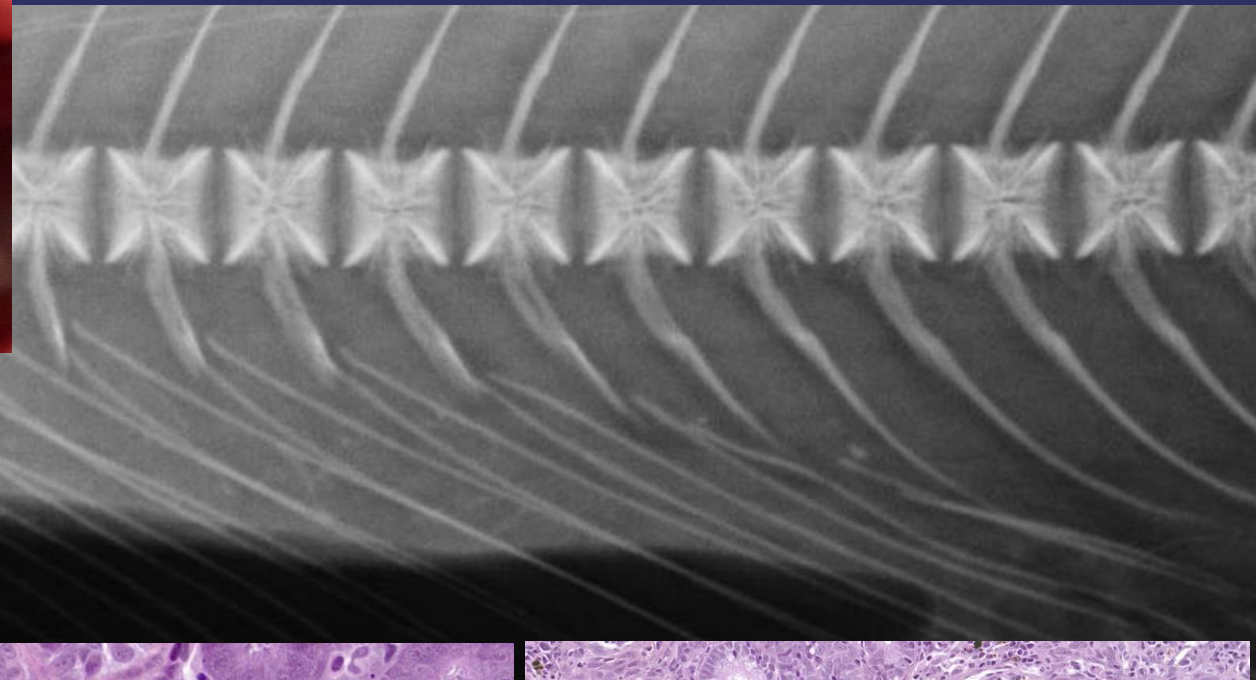


- Vi må komme dit at vi klarer å kategorisere NK funn på en måte som kobler det til klinisk bilde og makroskopiske funn.
- Anleggene trenger i tillegg til en akademisk beskrivelse av funn, en tydeligere formidling av hvor i sjiktet vi befinner oss.
- Hva vil prognosen være for denne fisken? Overleve?
- **Vi ønsker å bidra med verktøy som kan styrke feltpraktikeren (prognoseverktøy)**

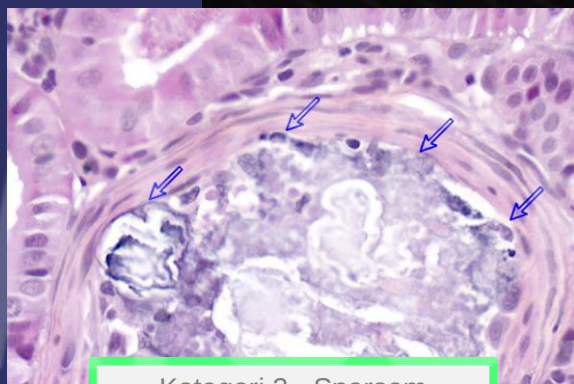


Eksempel 1: Rtgscore 2, macroscore 2, histoscore 15 = rikelige forandringer

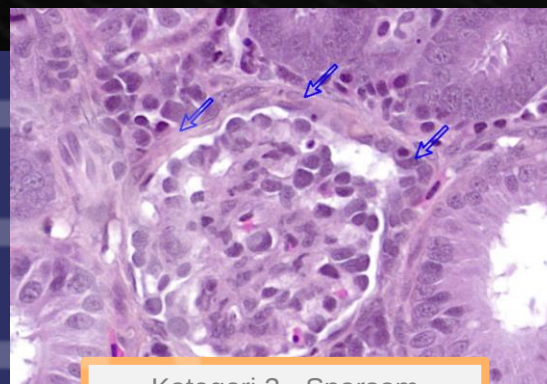
B34P1-CO2 - ørret



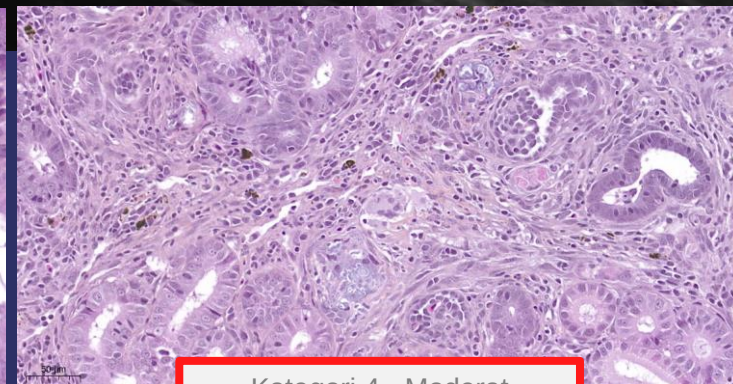
Kategori 1 - Moderat



Kategori 2 - Sparsom

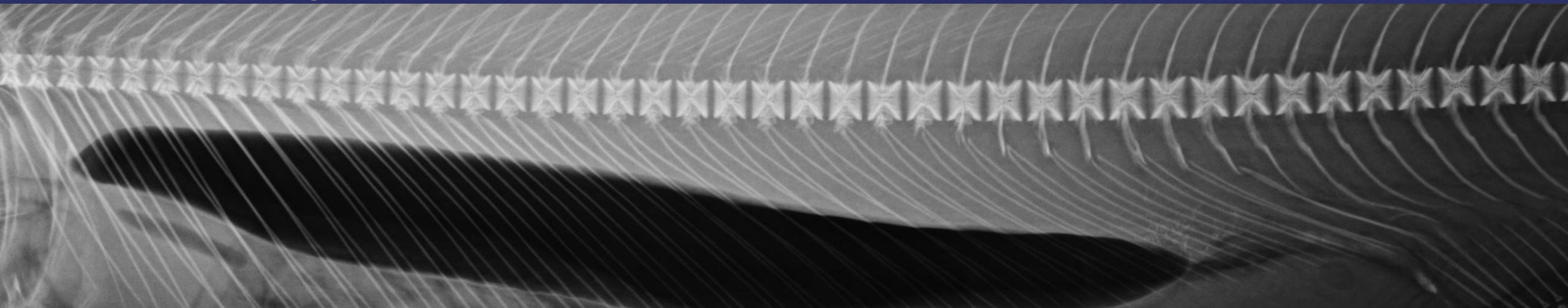


Kategori 3 - Sparsom



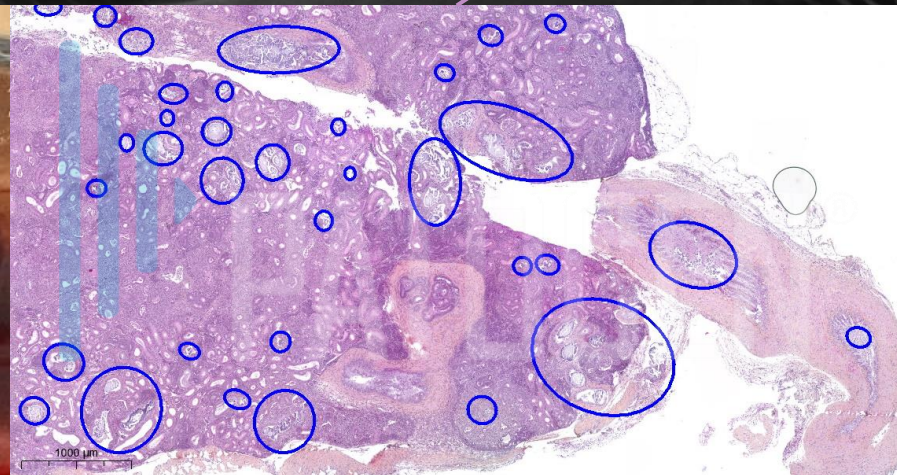
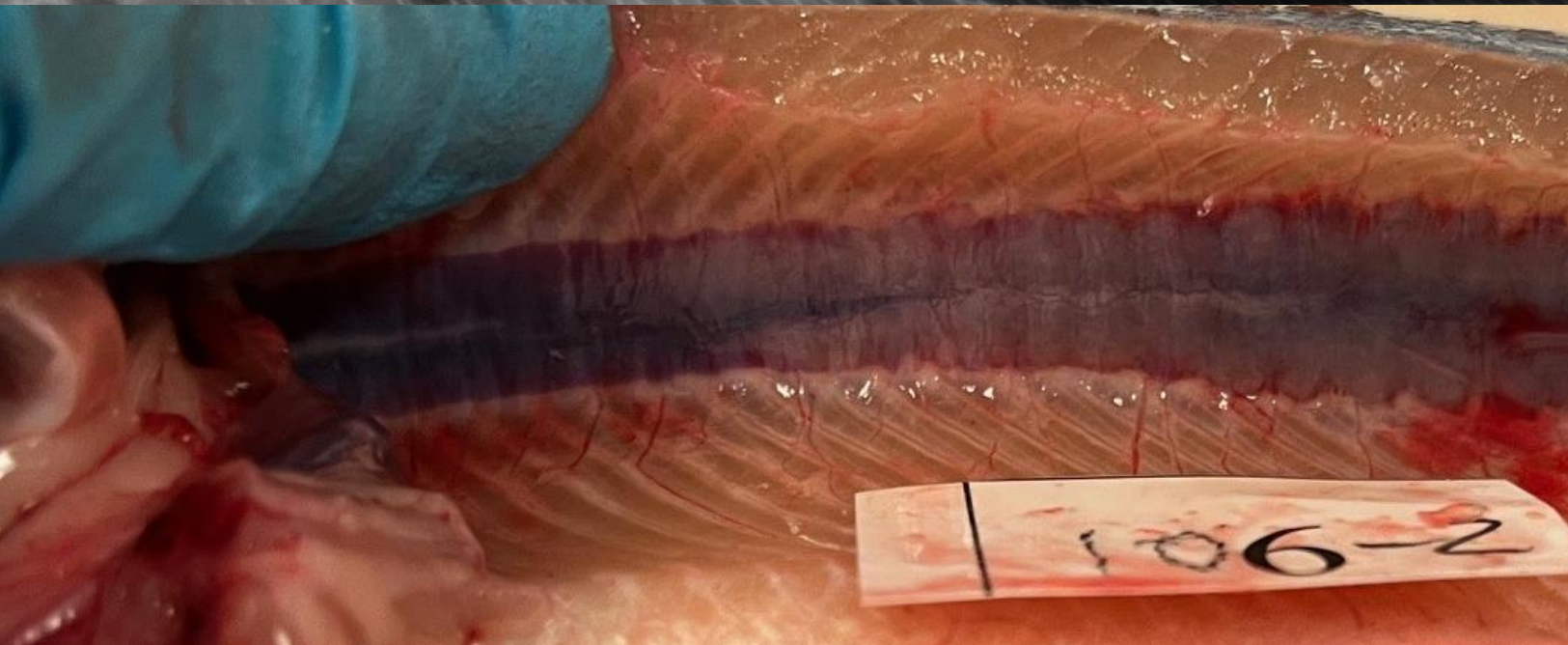
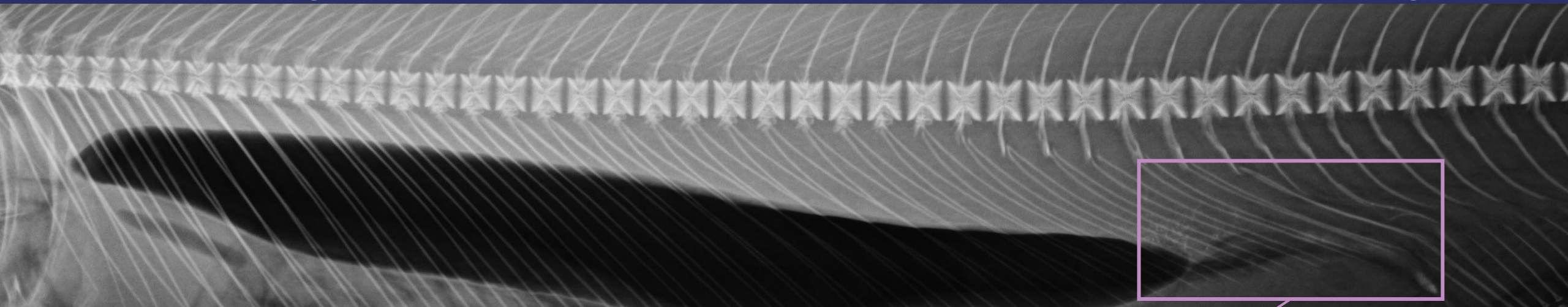
Kategori 4 - Moderat

Eksempel 2: Rtgscore 4-fibrose?, macroscore 0



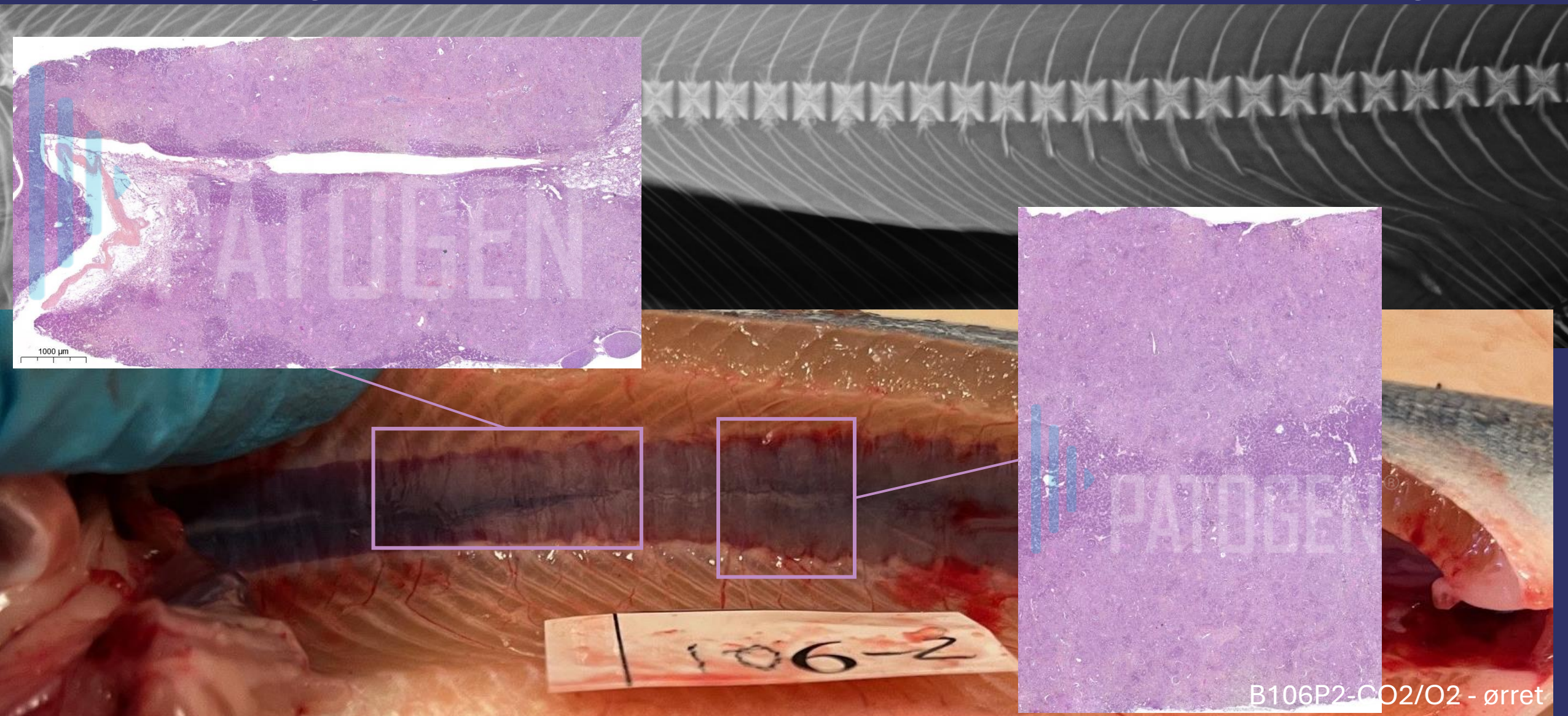
B106P2-CO2/O2 - ørret

Eksempel 2: Rtgscore 4-fibrose?, macroscore 0, histoscore 29 = uttalte forandringer

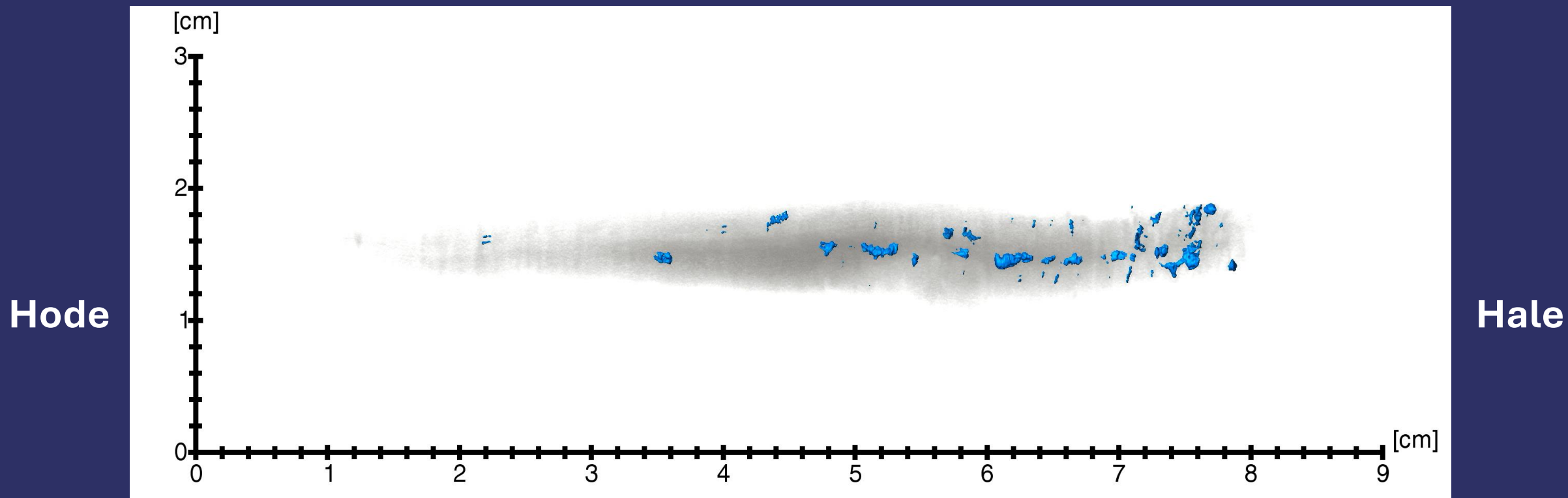


B106P2-CO2/O2 - ørret

Eksempel 2: Rtgscore 4-fibrose?, macroscore 0, histoscore 29 = uttalte forandringer



CT-skann (1600 bilder av nyre med mild nefro)



Harald Kryvi (Institutt for Biovitenskap), Ingunn Thorseth og Jan Magne Cederstrøm (Institutt for geovitenskap), UiB

Styrker og svakheter ved de forskjellige metodene:

	Styrker	Svakheter
Macroscore	Relativt raskt Kan verifiseres vha foto Avdekker annen patologi	Personavhengig Død fisk Fanger opp kun det som skjer overflatisk (mindre sensitiv)
Røntgen	Raskt Levende fisk Verifiserbart Spesifikk for forkalkninger	Utstyrsavhengig Ikke egnet på kroniske forandringer Mindre sensitiv ved liten fisk, dårlige bilder, lite uttalte eller kroniske forandringer
Histologi	Sensitiv og spesifikk Verifiserbart Tidlige, akutte og kroniske forandringer Avdekker annen patologi	Død fisk Tidkrevende Formalin



Til slutt en liten hilsen fra Alta: Røye fra Storsvannet, vill fisk i et uregulert vann langt fra nærmeste oppdrettskar.