

Mørke flekker i laksefilet

Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget

Mørkøre T.^a, Larsson, T.^a, Kvellestad A.S.^b, Koppang E.O.^b, Åsli, M.^a, Krasnov A.^a, Dessen J-E.^a, Moreno H.M.^c, Valen E.^b, Gannestad K.H.^a, Gjerde B.^a, Taksdal, T.^d, Bæverfjord G.^a, Meng, Y.^a, Heia K.^a, Wold J.P.^a, Borderias A.J.^c, Moghadam, H.^a, Romarheim, O.H.^a, K-A. Rørvik^a

^a Nofima, ^b Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, ^c CSIS Spania, ^d Veterinærinstituttet





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

ISBN: 978-82-8296-321-3 (trykt) ISBN: 978-82-8296-322-0 (pdf) ISSN 1890-579X	
Tittel: Mørke flekker i laksefilet Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget	Rapportnr.: 34/2015
Forfatter(e)/Prosjektleder: Mørkøre T. ^a , Larsson, T. ^a , Kvellestad A.S. ^b , Koppang E.O. ^b , Åsli, M. ^a , Krasnov A. ^a , Dessen J-E. ^a , Moreno H.M. ^c , Valen E. ^b , Gannestad K.H. ^a , Gjerde B. ^a , Taksdal, T. ^d , Bæverfjord G. ^a , Meng, Y. ^a , Heia K. ^a , Wold J.P. ^a , Borderias A.J. ^c , Moghadam, H. ^a , Romarheim, O.H. ^a , K-A. Rørvik ^a ^a Nofima, ^b NMBU, ^c CSIS Spain, Madrid, ^d Veterinærinstituttet	Tilgjengelighet: Åpen
Avdeling: Sjømatindustri	Dato: 31. oktober 2015
Oppdragsgiver: Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	Ant. sider og vedlegg: 79
Stikkord: Oppdrettslaks, melanin, mørke flekker, black spots, kvalitet	Oppdragsgivers ref.: FHF#900824, Kristian Prytz
Sammendrag: Forekomsten av mørke flekker i laksefilet har økt betraktelig senere årene. I dag har hver femte filet slike flekker som i hovedsak er opp til 3 cm i diameter og lokalisert til fileten bukrområde. Store ryggflekker har vist en urovekkende økning siden 2012. Forekomsten av flekker er høyere i Sør- og Midt-Norge enn lenger nord i landet. I våre forsøk fant vi de første flekkene tidlig i sjøfasen og deretter en økning i omfang og størrelse mot slakt. Flekkene skyldes en lokal vevsskade med sentutviklende betennelse og varierende mørk pigmentering, bindevevspåleiring, og økt nivå av visse mineraler og mikroorganismer. Betydningen av genetisk bakgrunn, vaksine og slaktehåndtering er ikke vesentlig, mens oppdrettsforhold, vaksineringsmetode, laksens helsetilstand og mekaniske skader kan påvirke utviklingen av flekker. For eksempel kan liten smolt ved utsett i sjø ha økt risiko for å utvikle mørke flekker og lavt oksygeninnhold i sjø kan øke forekomsten. Justert førsammensetning før slakt (økt nivå av antioksidanter) kan hemme utvikling, som viser at mørkpigmentering kan begrenses ved å utnytte biokjemisk kunnskap om melaninsyntese og helingsprosesser. Forekomsten av flekker i økologisk laks er generelt lavere enn i konvensjonell laks. I videre forskning er det viktig å identifisere faktorer som fremkaller vevsskader og samtidig utvikle tiltak som begrenser pigmentdeponering i skadet vev. Det er viktig å starte i tidlige livsfaser med å forhindre at vevsskader dannes og utvikles til mørke flekker. Ytterligere karakterisering av patologiske forandringer bør foretas og vurderes i forhold til sykdommer som HSMB og CMS. I prosjektet har vi utviklet registreringsrutiner av mørke flekker i industrien. Det nære samarbeidet med filetindustrien og deres leverandører av fisk har gitt pålitelig statistikk og nyttig kunnskap om faktorer som påvirker forekomsten av mørke flekker i kommersiell drift. Videre samhandling mellom forskning og industri er vesentlig for å utvikle tiltak for å begrense forekomsten av mørke flekker.	
English summary: Today, every fifth salmon fillet has "black spots". Most spots are less than 3 cm in diameter and localized to the abdominal fillet part. "Black spots" occur early in the seawater phase but the prevalence and the size of the spots increase toward slaughter. "Black spots" are associated with local chronic inflammation and scar formation. The importance of genetic background and vaccine are not significant. It takes time before melanin is deposited in injured tissue, hence slaughter methods and slaughter stress have no significant impact on development of "black spots". Farming conditions, water quality, vaccination method, the salmon's health condition and injuries during the farming phase can affect the development of "black spots".	

Forord

Prosjektet ble iverksatt etter ønske fra oppdrettsindustrien grunnet økt forekomst av mørke flekker i laksefilet. Kunnskapen om årsaker til at flekkene oppstår var svært begrenset og prosjektet fikk derved en bred tilnærming, fordelt på fire hovedaktiviteter: 1) Registrering av flekker i laksefilet ved filetanlegg etter en enhetlig mal og med tilhørende bakgrunnsinformasjon om fisken, 2) Betydningen av helse/sykdom og vaksine, 3) Fôrets betydning for forekomsten av mørke flekker, 4) Betydningen av klem- og slagskader, samt miljø (stress/trenging, vannkvalitet). I prosjektperioden ble tilnærmingen utvidet til også å omfatte undersøkelse av betydningen av fiskens genetiske bakgrunn for at det oppstår flekker i laksefileten. For å dekke den brede tilnærmingen i prosjektet var forskerteamet tverrfaglig sammensatt. Forfatterne av de ulike kapitlene er indikert i rapporten.

Medlemmene i styringsgruppen for prosjektet har vært: Øyvind Oaland (Marine Harvest ASA), Thina Kobberstad (Nordlaks AS), Line Rønning (Lerøy Midt AS), og Jan-Vidar Olsen (Salmar ASA). Styringsgruppen hadde en vesentlig rolle i prosjektet, blant annet for å sikre næringsrelevans for prosjektets forskningsaktiviteter, anvendelse og bidrag til registreringer og innhenting av bakgrunnsinformasjon om fisken og fiskemateriale til forskningen. En stor takk til styringsgruppen, samt også takk til andre bedrifter for vesentlige bidrag i form av diskusjoner, råd, datamateriale, råvarer og arbeidsinnsats: MSD Animal health, Scanvacc, Salmo Breed, Pure, Troll Salmon, Produs Aqua, Vikenco, Skretting, BioMar, Lofoten, Nova Sea, Brødrene Karlsen.

Forskningsinstituttene som var tilknyttet prosjektet var Nofima (prosjektledelse), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet Veterinærhøgskole (NMBU), Veterinærinstituttet og det spanske instituttet CSIC. Flere studenter har tatt sine oppgaver i tilknytning til prosjektet.

Prosjektet har organisert to arbeidsmøter (WorkShops, Gardermoen) med deltakelse av oppdrettsindustri, forvaltning og forskning, nasjonalt og internasjonalt. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) som finansierte prosjektet hadde en aktiv rolle gjennom hele prosjektperioden, ved FoU-koordinator Kristian Prytz som også bidro med kontaktformidling til industri og sikret at resultater fra prosjektet ble formidlet til næringen underveis. Denne arbeidsformen sikret ytterligere at prosjektet skjerpet fokus mot de problemstillingene som var pekt på som spesielt relevante av aktører innen oppdrettsindustrien. I denne rapporten presenteres de resultatene fra prosjektet som anses å være mest relevante.

Ås, 31/10-2015

Turid Mørkøre

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Formål.....	1
1.2	Fokusområder i prosjektet	1
2	Oppsummering	2
2.1	Forekomst.....	2
2.2	Melanin og betennelse.....	3
2.3	Vaksine og sykdom	3
2.4	Fôr.....	4
2.5	Fiskemateriale	4
2.6	Trenging og klemskader	5
2.7	Vannkvalitet.....	5
2.8	Oppsummering.....	5
3	Registreringer ved filetanlegg	8
3.1	Materiale og metoder	8
3.2	Resultater	10
3.3	Vaksinering	12
3.4	Økologisk produsert laks	12
3.5	Sykdom (PD, HSMB, CMS)	13
3.6	Ørret	15
3.7	Historisk utvikling 2003–2008	16
3.8	Konklusjon og oppfølging	18
4	Forsøkene i prosjektet, Materiale metode	20
4.1	Karakterisering av mørke flekker	20
4.2	Fiskeforsøk.....	21
4.2.1	Forsøk ettåring	21
4.2.2	Forsøk nullåring	22
4.2.3	Fôrene i forsøkene.....	23
5	Resultater – karakterisering av mørke flekker.....	28
5.1	Utseende og mikroskopi.....	28
	Melanisering av flekker	29
5.2	Plassering av flekkene	32
5.3	Tekstur og mineraler	34
5.4	Genanalyser	35
5.5	Konklusjon og oppfølging	36
6	Resultater – instrumentell deteksjon av mørke flekker i sløyd fisk	37
6.1	NIR	37
6.2	Avbildende spektroskopi	38
6.3	Konklusjon og oppfølging	39
7	Resultater - effekt av vaksine	40
7.1	Melanisering.....	40
7.2	Tilvekst.....	41
7.3	Konklusjon og oppfølging	44

8	Resultater – effekt av fôr	45
8.1	Tilvekst.....	45
8.2	Plasmaanalyser	45
8.3	Melanisering.....	46
8.4	Filetutbytte, katarakt.....	48
8.5	Mykotoksinet DON	51
8.6	Konklusjon og oppfølging	52
9	Resultater – effekt av temperatur i ferskvannsfasen	53
9.1	Melanisering.....	54
9.2	Konklusjon og oppfølging	54
10	Patologi	55
10.1	Materiale og metoder	55
10.1.1	Bearbeidelse og undersøkelse av rutine- og tilleggsprøver – histologi.....	59
10.1.2	Undersøkelse av rutine- og tilleggsprøver – molekylærbiologi.....	59
10.1.3	Undersøkelse av blodprøver – enzymer i serum.....	59
10.1.4	Undersøkelse av blodprøver - Piscine orthoreovirus (PRV)	60
10.1.5	Materiale i kryoblokker eller fiksert på glutaraldehyd	60
10.2	Resultater – 1-åringer som fikk normalfôr - patologi.....	60
10.2.1	Laks i ferskvann - patologiske forandringer	60
10.2.2	Laks i sjøvann - patologiske forandringer utenom muskulatur	60
10.2.3	Laks i sjøvann - patologiske forandringer i muskulatur.....	60
10.3	Resultater – 1-åringer som fikk ulike spesialfôr	64
10.4	Resultater – 1-åringer som fikk normal eller spesialfôr – enzymer i blodplasma	64
10.5	Resultater – 0-åringer.....	66
10.5.1	Patologiske forandringer	66
10.6	Resultater – 0- og 1-åringer som fikk normalfôr – PCR.....	67
10.7	Resultater – RT-qPCR for PRV	69
10.8	Samlet vurdering og oppfølging	69
11	Resultater – avl	71
11.1	Konklusjon og oppfølging	72
12	Resultater - stress og skader	73
12.1	Tetthet i merd.....	73
12.2	Vannkvalitet.....	73
12.3	Klem og slagskader	74
12.4	Trenging i forbindelse med slakt	75
12.5	Konklusjon og oppfølging	75
13	Presentasjoner og skriftlig materiale fra prosjektet.....	76
14	Referanser	79

1 Innledning

Utseendet på produktet er det første inntrykket som møter konsumenten, og god og jevn filetfarge er avgjørende for kvalitetsoppfatningen av oppdrettslaks. De senere årene har forekomsten av mørke, ofte brun-svarte flekker i filet vist en betydelig økning. De fleste flekkene er opp til 3 cm i diameter og de sitter i overflaten av fremre bukdel av fileten. Mørkpigmentert muskel er generelt et lokalt kvalitetsavvik som ikke aksepteres av markedet. Fett- og proteininnhold, rødfarge og tekstur vil være på linje med resten av partiet dersom flekken skjæres bort. For større og dypere flekker vil fjerning resultere i avvikende utseende, og fileter med større mørkpigmenterte områder kan ikke omsettes. Rund laks med mørke flekker i fileten har et normalt utseende og det er ikke mulig å sortere ut laks med mørk pigmentert muskel ved å bedømme den visuelt fra utsiden. Kvalitetsavviket må derved håndteres av kunden dersom laksen omsettes sløyd, og i dag er mørke filetflekker en viktig årsak til misnøye hos kundene, økonomiske tap og skadet omdømme for bedriftene. Kostnaden som bedriftene rapporterer ved slike fargeavvik varierer, men for fem år siden ble det årlige tapet estimert til mer enn 500 millioner kroner. Det betyr at bare en beskjeden reduksjon av problemet med mørke filetflekker vil gi stor økonomisk gevinst for bransjen.

1.1 Formål

Målet med prosjektet har vært å finne årsaker til at mørke flekker oppstår i filet av oppdrettslaks og å anbefale tiltak som kan bidra til å redusere problemet.

1.2 Fokusområder i prosjektet

Ved oppstarten av prosjektet var kunnskapsgrunnlaget magert og derfor ble tilnærmingen i prosjektet bred, organisert i fire områder som pågikk parallelt og i nært samarbeid med hverandre i prosjektperioden: høsten 2012–sommer 2015.

1: Kartlegging

Fremskaffe pålitelig statistikk basert på registreringer ved kommersielle filetanlegg etter en enhetlig mal og koble forekomst til driftsforhold, miljø og helse

2: Vaksine og helse

Undersøke om vaksinert laks har høyere forekomst av mørke flekker enn uvaksinert laks og om helsestatus påvirker forekomsten

3: Fôr og drift

Undersøke om det er mulig å redusere deponering av mørke pigmenter ved å justere fôrsammensetningen og om driftsforhold har betydning

4: Stress og skade

Undersøke om stress under produksjonen og ved slakt øker deponering av mørke pigmenter og om skade slik som klemskader ved sortering og slagskader kan ha betydning

I 2014 ble det iverksatt en tilleggsaktivitet i prosjektet der målet var å undersøke om målrettet avl kan bidra til å redusere utvikling av mørke flekker i filet.

Kompetansen til prosjektdeltakerne har vært tverrfaglig med en sterk involvering av industriaktører i hele verdikjeden.

2 Oppsummering

Forfattere: Turid Mørkøre, Thomas Larsson, Erling-Olaf Koppang, Aleksei Krasnov, Helena M. Moreno, Agnar Kvellestad

I dag har hver femte laksefilet en eller flere mørke flekker. Flekkene sitter hovedsakelig i fremre bukområde av fileten men vi ser en foruroligende økning av mørkpigmenterte rygger. Sykdom, fysiske skader og dårlig vannkvalitet kan øke forekomsten mens antioksidanter i fôret kan hemme utviklingen. Dette er viktig kunnskap for næringen som ønsker å finne løsninger på et vanskelig kvalitetsproblem. Prosjektet har dessuten utviklet nye forskningsverktøy som kan bidra til å finne årsaker og redusere forekomsten i fremtiden.

2.1 Forekomst

Mørke flekker i laksefilet er et problem som ble beskrevet for mer en 20 år siden (Koteng, 1992), men det er i de senere år at dette har utviklet seg til et vesentlig kvalitetsavvik. I 2003 begynte et norsk røykeri å føre statistikk på forekomsten av mørke flekker. På det tidspunktet hadde 7 av 100 fileter mørke flekker, men allerede fire år senere, i 2007, hadde forekomsten steget til 18 av 100 fileter. Den markante økningen skjedde i en periode med vesentlige endringer av laksens fôrseddel (spesielt økt bruk av rapsolje) samt økende utbrudd av sykdommene pankreas disease (PD) og hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB).

I 2011 begynte flere norske filetanlegg rutinemessige registreringer av mørke filetflekker i laks etter en enhetlig mal (nasjonal FHF-standard). Registreringene, som pågår ennå, rapporteres inn til en database som administreres av Nofima. Bedriftene registrerer 100 fileter hver gang og bakgrunnsinformasjon følger registreringene eller kan innhentes i etterkant. Databasen har nå passert 250.000 registreringer. Den store interessen blant norske bedrifter har bidratt til å styrke statistikkens etterrettelighet, og økt muligheten til å avdekke årsaksfaktorer. Skjema som benyttes til registreringene (Excel-format) kan lastes ned fra FHF sin hjemmeside eller fås tilsendt fra Nofima.

Våre registreringer viser at forekomsten av mørke flekker har økt betydelig i Midt- og Sør-Norge siden 2011, fra 16 % til 24 % i dag (Tabell 1). De fleste flekkene sitter i bukpartiet av fileten og har en diameter opp til 3 cm. Forekomsten av mørke flekker er betydelig lavere nord i landet (13%), men forekomsten av mørkpigmenterte rygger har vist en urovekkende økning. Små, tynne flekker kan skjæres bort og fileten vil da ha samme kvalitet som fileter uten flekker. Fileter med større mørkpigmenterte områder nedklassifiseres.

Tabell 1 Forekomst av mørke flekker i norsk oppdrettslaks (% av fileter).

År	Forekomst Norge	Forekomst Nord-Norge	Forekomst Midt-Norge
2011	13 %	11 %	16 %
2012	16 %	15 %	18 %
2013	18 %	13 %	20 %
2014	19 %	15 %	23 %
2015	19 %	13 %	24 %

2.2 Melanin og betennelse

Melanin (eumelanin) er et mørkebrunt pigment som finnes i de fleste dyr og planter. Melaninpigmenter er naturlige og nyttige antioksidanter som beskytter ulike vev, og de er viktige deler av immunforsvaret hos laks. Syntesen av melanin er en omstendelig prosess og i løpet av syntesen produseres ulike mellomprodukter som kan være giftige, for eksempel ved høyt fettnivå i muskelen. Vi vet ikke om høy melaninakkumulering kan øke innholdet av slike skadelige mellomprodukter.

Laks har melaninproduserende celler og en type betennelsesceller som produserer melanin, såkalte melanomakrofager. Vi har vist at melanin produseres i de mørke flekkene, og det er høyst sannsynlig at melanomakrofagene bidrar vesentlig til produksjonen av mørke pigmenter. Det er sannsynlig at laks, i motsetning til pattedyr, også bruker melanin til å begrense uønskede skader (oksideringsprosesser) ved betennelse. Insekter bruker melanin til å bekjempe virus, parasitter og bakterier ved å pakke de inn i substansen slik at de uskadeliggjøres. Mye tyder på at laksen benytter tilsvarende mekanismer, men da ikke som fritt melanin, men som melanin lokalisert til melanomakrofager.

I våre undersøkelser ble det gjennomgående påvist betennelse (inkludert melanomakrofager), heling (regenerasjon) og arrdannelse (fibrose) i mørke flekker. Flekkene kan således ha flere typer forandringer med både akutte og kroniske forandringer samtidig. Mørke flekker i laksefilet synes derved å være koblet til kronisk betennelse hvor arrvevsdannelse og/eller heling pågår parallelt. Arrdannelsene peker mot at de ikke forsvinner på lang tid, om noensinne. Genanalyser tyder på at betennelsen er forårsaket av antigener, dvs. enten hele mikroorganismer eller byggestener som laksen ikke klarer å kvitte seg med. Årsaken til at skaden oppstår i utgangspunktet er uvisst.

Våre resultater tyder på at mørke flekker i laksefilet skyldes betennelse eller reparasjonsprosess etter en vevsskade. Hyppige årsaker til vevsskader er infeksjoner relatert til mikroorganismer (bakterier, virus, sopp osv.). Andre årsaker kan være autoimmune prosesser (selvpåførte skader) eller skade med vevshenfall (støt, kutt). Det er viktig å finne opphavet til de lokale vevsskadene.

Ideelt blir skadede celler fjernet av betennelsesceller som selv blir nedbrutt når vevet er normalisert. Imidlertid kan opphopning av levende og døde betennelsesceller være så kraftig at det dannes en verkebyll (abscess). Hvis laksens betennelsesceller ikke klarer å fjerne årsaken (f.eks. bakterier, virus), kan betennelsen fortsette, eventuelt vil agens innkapsles og vevreaksjonen avta. Helingsprosessen påvirkes av vevets helingsevne, årsaken til skaden samt det ytre miljøet og ernæring.

2.3 Vaksine og sykdom

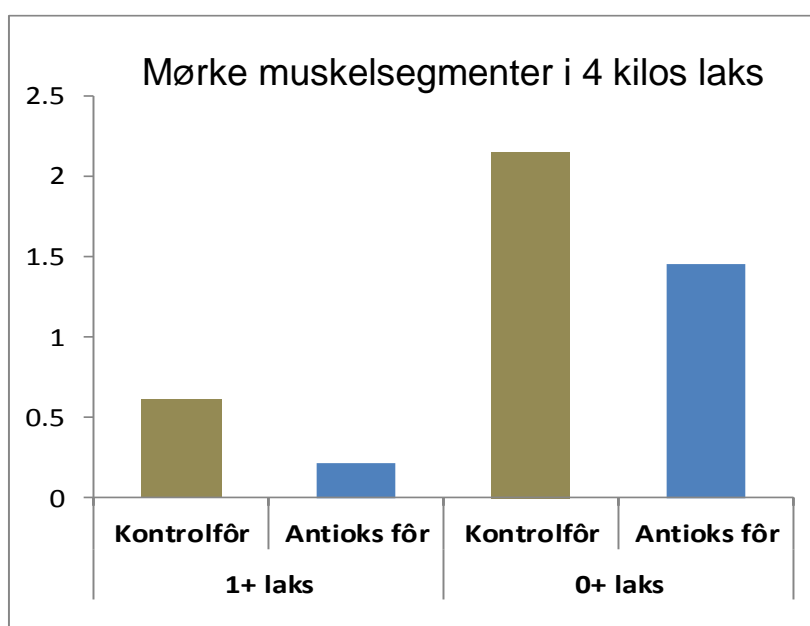
Vaksine var tidligere ansett som årsaken til mørke flekker i laksemuskel. I dag er vi sikre på at vaksine ikke er en viktig årsak, men feilstikk kan gi mørkpigmenterte flekker. Våre registreringer viser lavere forekomst av mørke flekker ved håndvaksinering enn maskinvaksinering. Forbedringer av selve vaksineringen kan derved redusere forekomsten av mørke flekker i fileten.

Vi har fokusert på sykdommene PD, HSMB og CMS i våre studier. Forekomsten av flekker øker ikke nødvendigvis etter PD-utbrudd, men risikoen for større og mere problematiske flekker synes å øke ved PD-utbrudd tett opp til slaktning (høyere for SAV3 enn for SAV2). Vi har imidlertid ikke grunnlag til å peke på en enkelt diagnose som hovedårsak til at det oppstår mørke flekker i fileten.

2.4 Fôr

Fôrets sammensetning har betydning for utviklingen av mørke flekker (fargeintensitet, størrelse). Kontrollerte forsøk i prosjektet viste at det er mulig å redusere mørkpigmentering ved å tilsette fôret ekstra antioksidanter. Vi undersøkte tilsetning av vitamin E, vitamin C og selen. Resultatene var tydelige for både ettåring og nullåring (Figur 1). Ekstra sinktilsetning ga også positiv effekt, men ikke så tydelig som for antioksidanter. Resultatene er lovende og viser at det er mulig å hemme utviklingen ved å tilsette fôret ingredienser som hemmer deponering av mørke pigmenter.

Økologisk oppdrettet laks ser ut til å ha lavere forekomst av mørke flekker i filet generelt, men enkelte slakteparti/lokaliteter med økologisk laks har vist normalt, høy forekomst.



Figur 1 Gjennomsnittlig antall mørke muskelsegmenter i laks som hadde fått et standardfôr eller det samme fôret tilsatt ekstra antioksidanter i cirka 3 måneder før slakting.

2.5 Fiskemateriale

Vi registrerte små, svakt pigmenterte flekker i filet når laksen passerte cirka 0,5 kg. Ved slakt hadde ettåringer (4kg) færre og svakere flekker enn nullåringer. De nullåringene som veide 110 g ved utsett veide 1 kg mer enn de som veide 70 g ved utsett (4,6 versus 3,6 kg) og den store nullåringen hadde 30 % færre flekker. Vi må se nærmere på årsakene til at høyere fiskevekt ved utsett i sjø sammenfalt med redusert forekomst av mørke flekker, og om det finnes noen størrelsesgrenser man bør ta hensyn til ved vaksinerings/utsett i sjø.

Avl og genetikk har vist stor betydning for melanisering av bukhinnen, men vi har kun funnet svak sammenheng mellom laksens familiebakgrunn og mørke flekker i selve fileten. Vi har imidlertid funn som tyder på at avl for motstandsdyktighet mot visse virustyper kan påvirke risikoen for melanindeponering i filet, men dette bør bekreftes/avkreftes. Vi har sett en betydelig økning i mørkpigmentert muskel i modnende laks, spesielt hannfisk.

2.6 Trenging og klemskader

Vi har gjennomført kontrollerte forsøk for å undersøke effekten av trenging og klemskader på utviklingen av mørke flekker. Våre studier viste ingen effekt av å trengte fisken i forbindelse med slakting, men trenging/flytting av fisk viste negative langtidseffekter. Det er stor sannsynlighet for utvikling av mørke flekker i fileten over tid dersom fisken utsettes for slag- og klemskader.

Slaktemetode har ikke vist noen vesentlig effekt på forekomsten av mørke filetflekker, men vi har sett en tendens til økt forekomst etter lang oppholdstid i ventemerde. Om dette er et tidsaspekt som kan knyttes til avstand fra opptak fra merde til slakt, miljøforhold eller annet er ukjent.

2.7 Vannkvalitet

Effekten av lavt oksygennivå i vannet synes å være betydelig. I et kontrollert forsøk holdt vi laksen ved lavt oksygennivå i en kort periode (minutter). Laksen fikk en kraftig økning av mørke flekker i fileten ved slakting to måneder senere.

2.8 Oppsummering

Forekomst av mørke flekker er koblet til en lokal, kronisk betennelse i fileten. Det er viktig å holde gode driftsforhold for å unngå det som utløser skade og deretter hemme utviklingen av betennelse og deponering av melaninpigmenter. En robust laks med god helsestatus er mindre utsatt for å utvikle mørke flekker, men dårlig vannkvalitet (lavt oksygennivå), flytting av fisk, stress og slag/klemskader kan øke forekomsten (langtidseffekter). Ekstra tilsetning av antioksidanter i fôret ser ut til å hemme utviklingen. Siden kjønnsmodning fører til økt melanisering, er det viktig å være oppmerksom på modnende laks, spesielt hannfisk. Vi har ikke sett effekt av avl eller slaktemetode, men smoltvekten ved utsett har vist vesentlig utslag. Effekten av virus og bakterier er fortsatt uklar og vi har også behov for bedre forståelse av betydningen av smoltutsett (tidspunkt og størrelse) og helningsprosesser i laksemuskelen. Mest av alt har vi behov for å forstå hvorfor det i utgangspunktet oppstår betennelse i fileten. Det vet vi fortsatt ikke, men vi har nå fått verdifull kunnskap om hvordan begrense betennelsesutviklingen og melanindeponeringen i skadet vev.

Tabell 2 Oversikt som viser effekt av ulike faktorer på mørkpigmentering av laksefilet.

Faktor	Nei	Kanskje	Ja	Kommentar
Bedøvelse (slag/elektrisitet)	X			El-bedøvelse ved slakt kan i noen tilfeller gi blødninger i filet, men ikke melanin
Genetisk bakgrunn/avl	X			Vi har gjennomført en omfattende studie. Den viste lav arvbarhet for flekker i filet (buk og rygg)
Slaktefisk, størrelsesklasse	X			Effekt av størrelse kan være tydelig. I noen tilfeller er forekomsten høyest for den største laksen, ved andre tilfeller den minste laksen
Vaksine	X			Ingen forskjell mellom vaksinert og uvaksinert laks. Respons på betennelse/melanisering kan variere mellom vaksineprodusenter
Avlusing		X		Har sett tendens til at mange uttak fra samme merd/mange avlusinger øker forekomsten
Transportdistanse til slakteri		X		Lang transportavstand til slakteri kan påvirke forekomsten (svak sammenheng). Flytting av fisk ser ut til å være kritisk generelt.
Temperatur i sjø		X		Effekt av temperatur kun i enkelttilfeller (brå temperaturøkning vist sammenheng med økt melanisering)
Ventemerd		X		I enkelttilfeller negativ effekt av lang oppholdstid i ventemerd
Sykdom		X	X	Risikoen for problematiske flekker øker etter PD-utbrudd, spesielt om utbruddet skjer tett opp til slakting (SAV3 større effekt enn SAV2). Mistanke om at HSMB øker risikoen, muligens også CMS.
Fôr og føring			X	Antioksidanter ser ut til å hemme utviklingen.
Kvalitetsklasse			X	Produksjonsfisk (bedømt utvendig) noe høyere forekomst av mørke flekker i filet
Klem, slagskader			X	Ytre klem-/slagskader kan gi indre blødninger som kan utvikle seg til melaniserte flekker. Langtidseffekter
Smolt			X	Forskjeller mellom settefiskanlegg. Funnet mer mørke flekker i nullåringer enn ettåringer i kontrollert forsøk. Lavere forekomst i nullåringer satt ut som 100 g smolt versus 70 g smolt i forsøk
Vaksinering			X	Høyere forekomst ved maskinvaksinering
Vannkvalitet			X	Økt forekomst av mørke filetflekker i laks eksponert for lavt oksygen i vannet
Økologisk produksjon			X	Generelt lavere forekomst ved økologisk produksjon



Figur 2 Oversikt over bedrifter og forskningspartnere i prosjektet



Figur 3 I prosjektet hadde vi jevnlig møter for å diskutere oppnådde resultater og planlegge forsøk og analyser. Bildet er fra første prosjektmøte med deltakerne (fra venstre) N.Guillon (Univ Brest, student fysiologi), T.Mørkøre (Nofima, prosjektleder), M. Bjerke (Nofima, lab ansvarlig), H.Moreno (CSIC, Spania bindevev og kjemi), M.Åsli* (Nofima, prosjektmedarbeider), J.Borderias (CSIC, Spania bindevev og kjemi), T.Håvland (MSD, Animal Health, vaksinerings), J.S.Torgersen* (Nofima, histologi), K.Heia (Nofima, måleteknologi), L.Speilberg (Scanvacc, melanisering), T.Larsson (Nofima, statistikkansvarlig, prosjektmedarbeider), A.Kvellestad (Norges veterinærhøgskole, patologi), EO. Koppang (Norges veterinærhøgskole, ansvarlig patologi/effekt av sykdom på melanisering).

* gått over i andre stillinger i prosjektperioden

3 Registreringer ved filetanlegg

Forfattere: Thomas Larsson, Magnus Åsli, Torunn Taksdal, Jens-Erik Dessen, Turid Mørkøre

Formålet med registreringene var å produsere pålitelig statistikk for forekomsten av mørke flekker, følge utviklingen over tid og finne årsakssammenhenger. I praktisk oppdrett varierer mange faktorer gjennom oppdrettsfasen, for eksempel miljø, fôr, sykdomsutbrudd og driftsforhold. Derfor kan det være utfordrende å trekke ut betydningen av enkeltfaktorer for forekomsten av mørke flekker. Statistiske analyser av store datasett kan imidlertid gi informasjon om generelle mønstre og peke på oppdrettsforhold som bør få oppmerksomhet for å redusere problemet. I dette prosjektet benyttet vi en epidemiologisk tilnærming for å finne årsakssammenhenger.

3.1 Materiale og metoder

Vi begynte å registrere forekomsten av mørke flekker i fileter av oppdrettslaks i 2011. Registreringene ble utført rutinemessig ved flere filetanlegg med en geografisk spredning etter en nasjonal FHF-standard som ble utviklet i FHF-prosjekt 900265. Registreringene ble rutinemessig tatt av 100 tilfeldige fileter som passerer på filetlinjen. Registreringene ble rapportert elektronisk til en database, administrert av Nofima. Siden vi startet med registreringene i 2011, har antallet bedrifter som bidrar med registreringer vært økende. Den store interessen fra industrien har bidratt til å styrke statistikkens etterrettelighet, og også muligheten til å avdekke årsaksfaktorer. I dag består databasen av over 250.000 enkeltregistreringer.

Skalaen som benyttes ved registreringene er vist i Tabell 3, og områder på fileten som blir vurdert er vist i Figur 4. For hvert parti registreres 100 fileter. Resultatene som presenteres her er basert på registreringer utført i perioden høsten 2012 til sommeren 2015. I tillegg er resultater inkludert fra et tidligere FHF-prosjekt (2011; FHF 900265). Det første registreringsskjema ble utarbeidet i 2011 i samarbeid med kvalitetskontrollører ved bedriftene som leverer registreringer inn til databasen. Skjemaet har blitt oppdatert i prosjektperioden, basert på innspill fra bedriftene. I nyeste versjonen av skjema illustreres registreringene grafisk samtidig som de legges inn i malen. Derved får kvalitetskontrollørene og bedriftene nyttig og oppdatert oversikt over kvaliteten av laksen før den sendes på markedet. Registreringsskjemaet (Excelformat, norsk og engelsk utgave) kan lastes ned fra FHF sin hjemmeside eller fås tilsendt fra Nofima om ønskelig. Et utsnitt av skjemaet er vist i Figur 5.

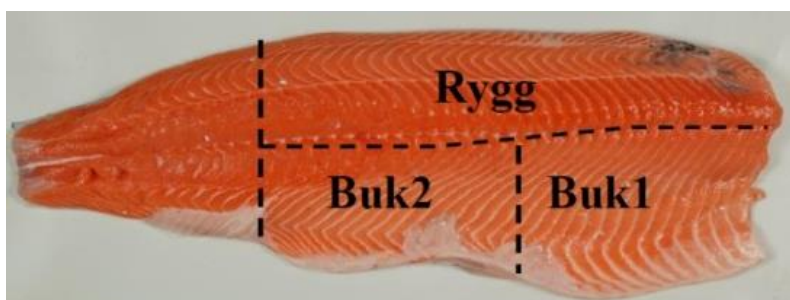
Bedrifter som har bidratt med registreringer har mottatt kvartalsrapporter med gjennomsnittlig forekomst av mørke flekker i laksefilet per kvartal og per år for deres lokaliteter/slakteri, satt opp mot gjennomsnittet for Norge (Figur 6).

Bedriftene har hatt mulighet til å legge inn bakgrunnsinformasjon om laksen, blant annet laksens genetiske opphav, vaksine, fôr, miljø, slakting – herunder brønnbåt, tid i ventemerde, bedøvelse. Dybdeanalyser av utvalgte fiskegrupper har basert seg på opplysninger om fisken fra de generelle registreringene men også ytterligere opplysninger fra oppdretterne. Tilgang på nasjonale og internasjonale databaser med registreringer av miljødata har gitt oss informasjon om årstids- og geografiske variasjoner i miljøparametere slik som oksygen, organisk materiale i sjøen med mer. For å være i stand til å peke på årsaksfaktorer har vi også undersøkt utvalgte fiskegrupper med generelt svært høy forekomst av mørke filetflekker eller generelt svært lav forekomst av mørke flekker. I all

kommunikasjon er fiskens opphav anonymisert. Ulike typer statistiske metoder har vært benyttet for å analysere registreringene (en-, toveis ANOVA og ulike typer multivariat data analyse).

Tabell 3 Skala for registrering av mørke flekker i filet i henhold til den nasjonale FHF-standard.

Flekker	Poeng
Ingen misfarging	0
Diffus flekk, alle størrelser	1
Markert flekk mindre enn 3cm	2
Markert flekk 3 - 6cm	4
Område større enn 6cm	8



Figur 4 Områder på filet som vurderes for mørke flekker i henhold til den nasjonale FHF-standard.

FLEKKER (poeng)				
Ingen misfarging	0	Flekk 3 - 6cm	4	
Diffus flekk, alle størrelser	1	Område større enn 6cm	8	
Flekk mindre enn 3cm	2	Gjennomsnitt	0.33	

FLEKK (poeng)				
Buk1	7	10	0	0
Buk2	3	1	0	0
Rygg	1	0	0	0
Total	11	11	0	0

FLEKKERT I FILET (poeng)				
Filet	Total poeng	Buk 1	Buk 2	Rygg
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	2	2	0	0
5	1	1	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	1	1	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	1	1	0	0
14	0	0	0	0
15	1	1	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	2	2	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

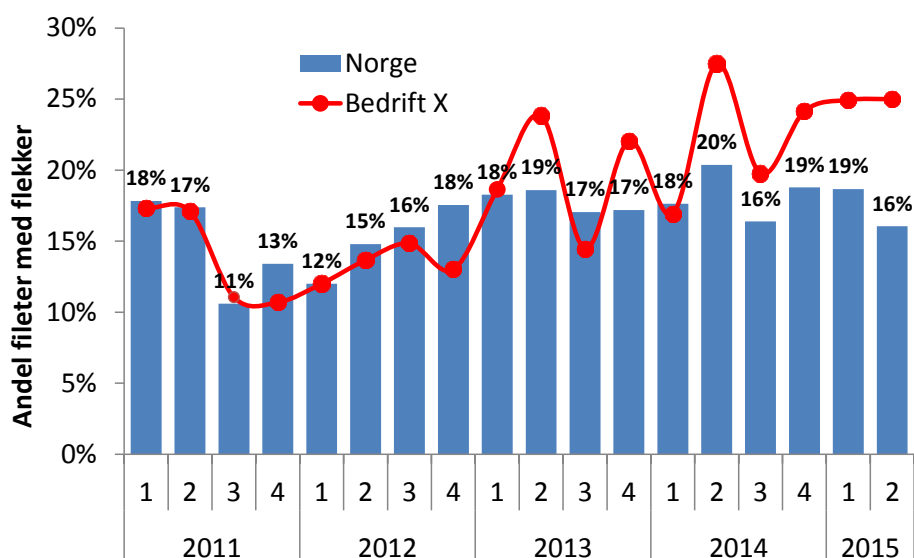
FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	
Buk1	7	10	0
Buk2	3	1	0
Rygg	1	0	0
Total	11	11	0

FLEKK (poeng)		Totalt %	

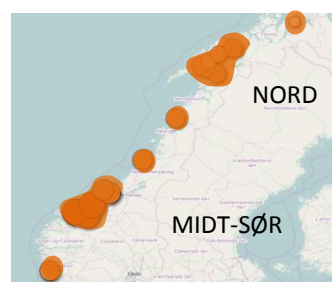


Figur 6 Eksempel på rapport av forekomst av mørke flekker i laksefilet, per kvartal og år. Søylen viser snitt for Norge, og den røde linjen viser gjennomsnittlig forekomst for Bedrift X.

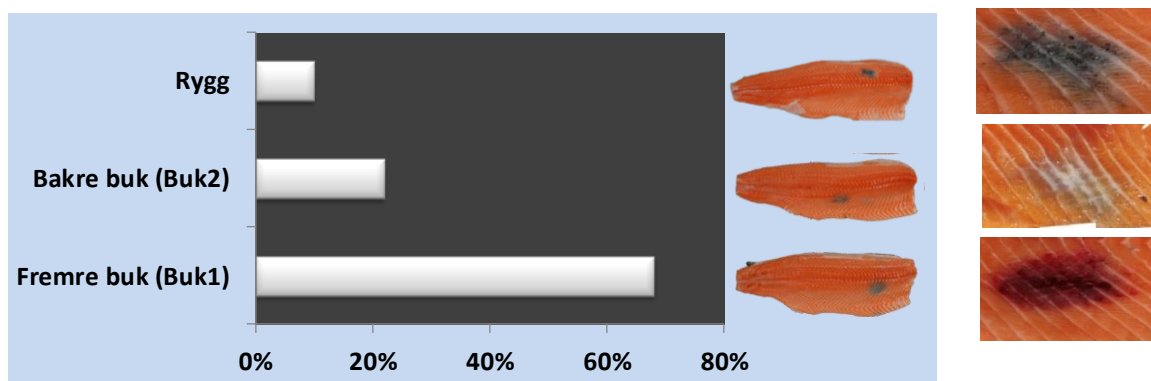
3.2 Resultater

Den gjennomsnittlige andelen av fileter med mørke flekker av norsk laks har økt fra 13 % i 2011 til 19 % i dag (Tabell 1, Figur 7). Av filetene som hadde mørke flekker befant 3 av fire flekker seg i fremre bukområdet («Buk 1»; Figur 4, Figur 8). Andelen fileter med flekker i ryggdelen har imidlertid økt fra 0,8 % i 2011 til 2,3 % i 2015 (Figur 7d), og det er i ryggen at de største flekkene forekommer. I Midt-Norge hadde flere fileter flekker i ryggdelen sammenlignet med Nord-Norge, men problemet med store ryggflekker (større enn 3cm) var betydelig høyere i Nord-Norge (57 % av ryggflekkene) enn i Midt-Norge (18 % av ryggflekkene) (Figur 9). Dette er en urovekkende utvikling.

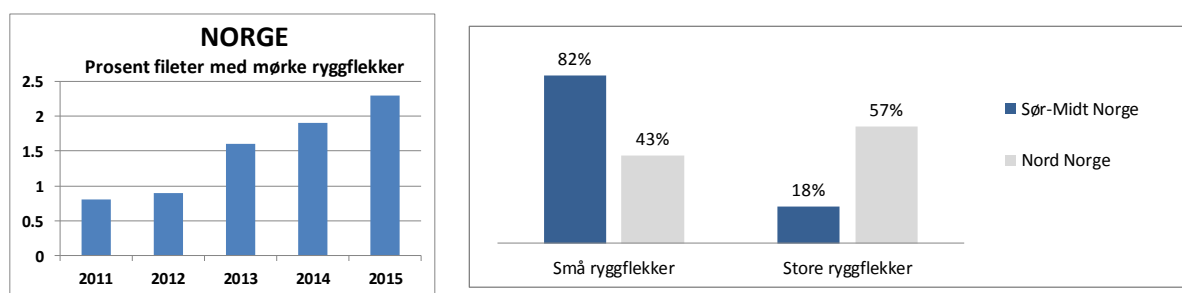
	Prosent fileter med mørke flekker		
	Hele Norge	Sør og Midt-Norge	Nord-Norge
2011	13	16	11
2012	16	18	15
2013	18	20	13
2014	19	23	15
2015	19	24	13



Figur 7 Utviklingen av mørke flekker i norsk oppdrettslaks fra 2011–2015. Laksen som danner grunnlaget for statistikken kommer fra områdene vist på figuren til høyre. Totalt har det blitt registrert mørke flekker på 22–65.000 fileter per år fra 2011 til 2015 (per juni 2015).



Figur 8 De fleste flekkene sitter i bukdelen av fileten, men mørke flekker i ryggpartiet er økende. Flekkene kan ha ulikt utseende (bilder til høyre), den generelle betegnelsen er «melaninflekker».



Figur 9 Utvikling av mørke flekker i ryggen for hele landet i perioden 2011 – 2015 (venstre figur) og størrelsen på ryggflekkene i Sør-Midt Norge sammenlignet med Nord-Norge. Små flekker er mindre enn 3 cm i diameter, store flekker er større enn 3 cm i diameter. Store ryggflekker er svært problematiske og fører til nedklassifisering og reklamasjoner.

Andelen fileter med mørke flekker er høyere i Sør og Midt-Norge (24 %) enn i Nord-Norge (13 %)

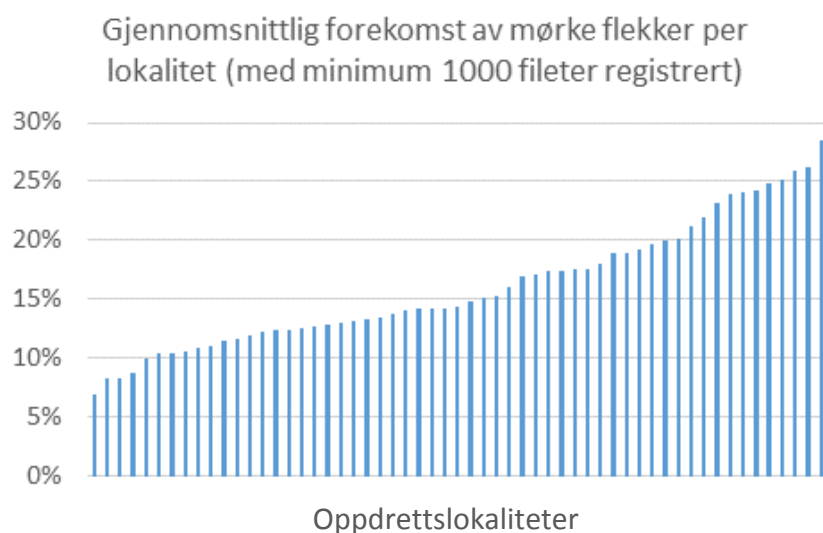
De fleste flekker sitter i fremre delen av buken

Store ryggflekker er et økende problem i Nord-Norge

Det kan være utfordrende å finne betydningen av enkeltfaktorer for utvikling av mørke filetflekker i kommersielt oppdrett siden det er så mange faktorer som varierer samtidig (f.eks. fôrbytte, strøm- og temperaturvariasjoner, avlusing, tilstedeværelse av virus/bakterier og så videre). Imidlertid kan det være mulig å finne generelle trender ved å analysere store datamengder. Det store datamaterialet (cirka 250.000 observasjoner) som vi har fått fra industrien over tid (2011–2015) øker muligheten til å finne slike generelle trender (metaanalyse).

Forekomsten av mørke flekker viser stor variasjon mellom lokaliteter. Figur 10 viser en oversikt over 60 lokaliteter der vi har flere enn 1000 observasjoner per lokalitet. Som det fremgår av figuren var det kun 4 lokaliteter med forekomster under 10 %. En forekomst på 7 % var absolutt minimum over tid. Det var tre lokaliteter der over 25 % av filetene hadde mørke flekker over tid.

I tillegg til å analysere generelle trender, har vi sett på faktorer som kjennetegner anlegg som over tid har vist høy eller lav forekomst av mørke flekker. For disse anleggene har vi fått tilleggsopplysninger fra oppdretterne (smoltleverandør og stamme, vaksinetype, temperaturprofil, antall avlusinger, fôringsregimer, kliniske utbrudd av sykdom og så videre). Tabell 2 oppsummerer effekten av ulike faktorer på deponering av mørke pigmenter i laksefilet, basert på registreringene fra filetindustri og fra kontrollerte forsøk i prosjektet.



Figur 10 Forekomst av mørke flekker viser stor variasjon mellom lokaliteter, også innen samme geografiske område. Lokaliteter med generelt lav eller høy forekomst av mørke flekker ble undersøkt grundig for å finne felles kjennetegn (hver søyle viser gjennomsnittlig forekomst i % av fileter).

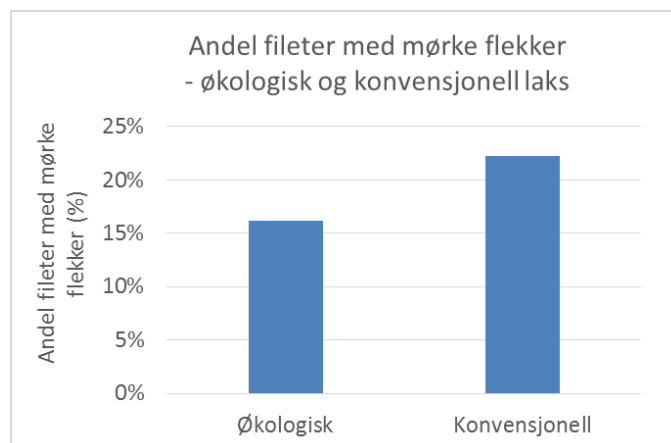
3.3 Vaksinerings

Våre registreringer tyder på at maskinvaksinerings kan gi flere og større flekker av melanin sammenlignet med håndvaksinerings. For 2013 og 2014 hadde maskinvaksinert laks 5% enheter høyere forekomst av flekker enn håndvaksinert. Denne trenden var den samme for registreringene i Nord og Midt-Norge. Så langt i år har forskjellen mellom maskin og håndvaksinert vært betydelig mindre, men det er grunn til å følge utviklingen og å ha fokus på optimalisering av selve vaksinerings.

3.4 Økologisk produsert laks

Økologisk oppdrett av laks så ut til å resultere i lavere forekomst av mørke flekker i filet (Figur 11). Basert på registreringer fra samme geografiske område hadde økologisk produsert laks i gjennomsnitt signifikant lavere forekomster av mørke flekker enn den konvensjonelle ($P < 0,0001$ ved t-test). Flekkene i økologisk laks var også mindre i diameter sammenlignet med konvensjonell laks. Kun 1,5 % av filetene hadde store flekker (større enn 3 cm i diameter), mot 4 % for den konvensjonelle laksen.

Økologisk produsert laks hadde færre og svakere flekker i filet sammenlignet med konvensjonell laks



Figur 11 Andelen fileter med mørke flekker (%) for økologisk og konvensjonelt produsert laks innen samme geografiske område i perioden 2012 – 2015.

3.5 Sykdom (PD, HSMB, CMS)

Pankreassykdom (PD) er en svært smittsom virussykdom for laksefisk i oppdrett i sjø. Sykdommen har vært påvist på Vestlandet siden andre halvdel av 1980-tallet. I 2003–2004 begynte den å spre seg sørover og nordover fra kjerneområdet i Hordaland. Årsak til sykdommen er *Salmonid alphavirus* (SAV) og fram til 2010 var det bare SAV subtype 3 (SAV3) som hadde vært påvist i Norge. En ny type, marin SAV2, har siden den første registreringen i Romsdal i 2010, spredt seg raskt i Midt-Norge. Det ble registrert totalt 142 nye tilfeller av pankreassykdom i 2014 (Fiskehelserapporten 2015).

Vi har undersøkt betydningen av PD ved å koble PD-diagnoser fra Veterinærinstituttet (VI) med registreringene av mørke flekker utført av industrien. Veterinærinstituttet benytter betegnelsene:

SAV3 område

- «Påvist PD»: Klinisk sykdom på lokaliteten. Typisk histopatologi for PD
Påvisning av PD-virus (PCR, immunhistokjemi og/eller dyrking i cellekultur)
- «Mistanke PD»: Klinisk sykdom på lokaliteten
Og enten: Typisk histopatologi for PD. Prøver for viruspåvisning ikke innsendt
Eller: Histopatologisk undersøkelse ikke avsluttet. Påvisning av virus ved PCR og/eller dyrking i cellekultur

SAV2 område

- «Påvist PD»: Klinisk sykdom på lokaliteten og/eller typisk histopatologi for PD
Påvisning av PD-virus (PCR, immunhistokjemi og/eller dyrking i cellekultur)
- «Mistanke PD»: Enten: Klinisk sykdom på lokaliteten
Eller: Typisk histopatologi for PD. Påvisning av SAV2

Våre undersøkelser har hatt fokus på betydningen av PD SAV2, ettersom det er kjent fra tidligere at PD SAV3 øker risikoen for å utvikle mørke flekker. Sammenhengen ble undersøkt for laks oppdrett i Møre og Romsdal og Trøndelag. I likhet med tidligere observasjoner, fant vi økt risiko for å utvikle mørke flekker i filet hos laks med PD SAV2. Det er interessant at det særlig var laks med «Mistanke om PD» som hadde økt forekomst av mørke flekker (27% av filetene) mens laks diagnostisert med klinisk PD kun hadde en økning på 2 prosentenheter sammenlignet med laks uten PD påvisning. Det er mulig at avstanden fra smitte til slakt kan ha påvirket resultatene. Generelt var det flere måneder fra klinisk PD påvisning til slakt, og vi vet at sannsynligheten for avvikende filetkvalitet avtar med økende avstand i tid fra PD utbrudd til slakt (Lerfall m.fl. 2012 som undersøkte betydningen av SAV3).



Figur 12 Effekt av pankreassykdom på forekomst av mørke flekker. Resultatene er vist som prosent av fileter. Hovedvekten av laksen hadde PD SAV2.

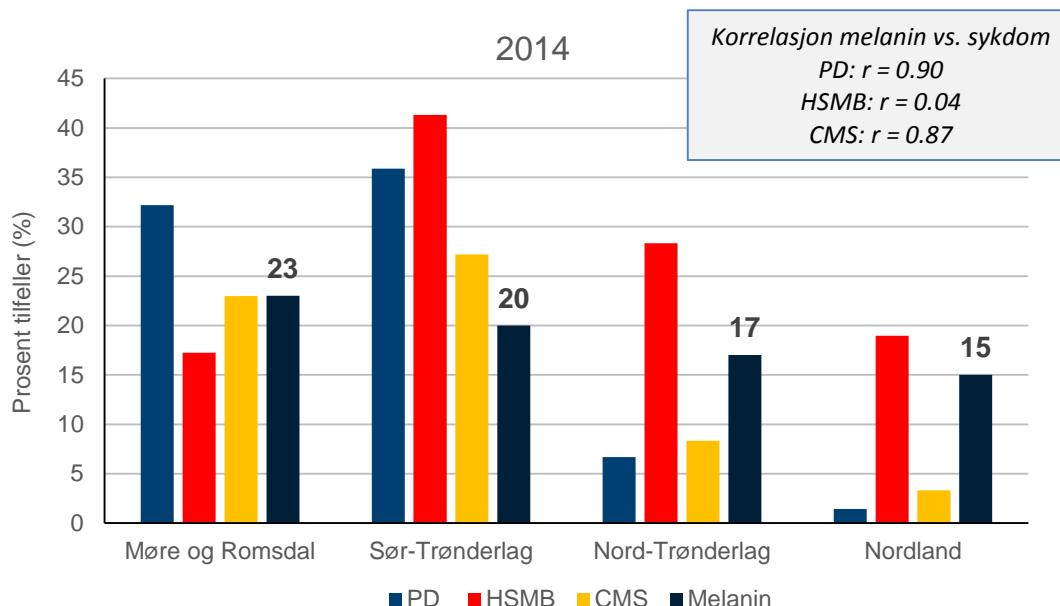
Sammenhengen mellom mørke flekker i filet og utbrudd av PD, HSMB og CMS ble undersøkt for de fylkene der vi har flest registreringer av mørke flekker i filet. Fiskehelserapporten angir antall lokaliteter med utbrudd, fylkesvis. For å kunne sammenligne geografiske områder beregnet vi andel lokaliteter med sykdomsutbrudd som prosent av totale lokaliteter (Figur 13).

Hjerte- og skjelettmuskebetennelse (HSMB) ble første gang påvist i 1999, og har siden blitt funnet ved sykdomsutbrudd i oppdrettsanlegg langs hele kysten. I 2014 ble HSMB utbrudd innrapportert for 181 lokaliteter til Veterinærinstituttet. Laks som dør av HSMB, har ofte betydelige sirkulasjonsforstyrrelser. Under klinisk sykdomsutbrudd har laksen også ofte betennelse i skjelettmuskulatur og nylig hevdet Bjørgen og medforfattere (Bjørgen m.fl. 2015) at viruset som forårsaker HSMB (*Piscint reovirus*, PRV) må være tilstede for at skal utvikles mørke flekker i laksefilet. Dette er viktig kunnskap, men det er fortsatt uklart hva som utløser mørkpigmenteringen.

Piscint reovirus (PRV) finnes ofte norsk oppdrettslaks og det er også påvist hos villaks. PRV finnes alltid hos fisk med HSMB, men fisk kan ha betydelige virusmengder uten å utvikle HSMB. Sykdommen er ikke påvist hos vill laksefisk og det er sannsynlig at HSMB er en tilstand knyttet til oppdrettsbetingelser hos oppdrettslaks. Faktorer som trolig bidrar til å utløse utbrudd er, ifølge Veterinærinstituttet, ernæring, stress, autoimmune reaksjoner, hypoksi, temperaturforhold osv. Andre agens kan også være involvert.

Kardiomyopatisyndrom (CMS), også kalt hjertesprekk, er en alvorlig hjertelidelse som oftest rammer slaktemoden oppdrettslaks. Veterinærinstituttet påviste 107 tilfeller av CMS i 2014. Dette er fjerde året på rad at antall påviste tilfeller av sykdommen øker. Det er flest lokaliteter med CMS-påvisninger i Møre og Romsdal og Sør-Trøndelag. CMS-virus har vært påvist fra oppdrettsanlegg med laks lang tid forut for utbrudd (> ni måneder), men påvises som regel i forbindelse med utbrudd av CMS eller i laks med CMS-forandringer i hjertet. Klinisk kan sykdommen minne om både PD og HSMB, som alle gir større sirkulasjonsforstyrrelser, men CMS gir normalt ikke forandringer i skjelettmuskulatur (www.vetinst.no/faktaark/CMS).

Våre registreringer av mørke flekker viser en tydelig avtakende forekomst fra Møre og Romsdal til Nordland, fra 23% til 15% av laksefiletene prosessert. Forekomsten av mørke flekker viser høyest korrelasjon med sykdomsutbrudd av PD og CMS og lavest for HSMB. En korrelasjon sier imidlertid ikke noe om årsaksforhold og sammenhengen mellom sykdomsutbrudd og forekomsten av mørke flekker må fortsatt anses å være uklar.



Figur 13 Utbrudd av PD, HSMB og CMS samt andel fileter med mørke flekker (% fileter) for Møre og Romsdal, Sør-Trøndelag, Nord-Trøndelag og Nordland. Registreringene av sykdomstilfeller er hentet fra Fiskehelserapporten 2014 og justert i forhold til antall lokaliteter i hvert av fylkene.

PD SAV2 \Rightarrow 2% enheter flere fileter med mørke flekker i gjennomsnitt
«Mistanke om PD, SAV2» \Rightarrow 10% enheter flere fileter med mørke flekker

Geografisk gradient

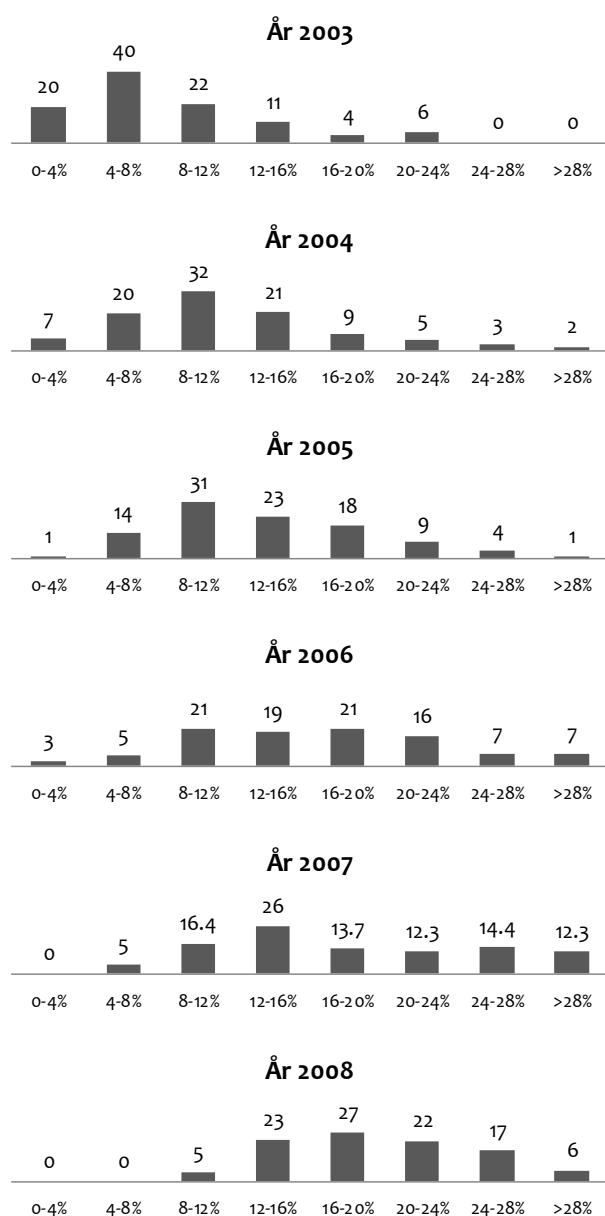
Melanin, PD, CMS viser samme avtakende forekomst fra Møre og Romsdal \Rightarrow Nordland
HSMB ingen signifikant geografisk korrelasjon

3.6 Ørret

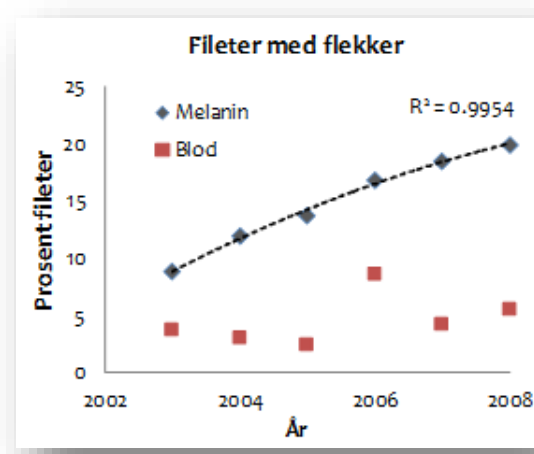
Filetanleggene i prosjektet utførte noen registreringer av mørke flekker på filet av oppdrettsørret ($n = 7000$ totalt). Fra 2011 til 2015 var forekomsten av mørke flekker i ørretfilet stabil på 1–2 % i gjennomsnitt, hvilket er betydelig lavere enn for laks. Plasseringen av flekkene var tilsvarende som for laksen med 76 % av flekkene lokalisert i den fremre delen av buken. For ørret med flekker, var imidlertid flere flekker lokalisert i ryggen (6,6 %) sammenlignet med laks (2,3 %).

3.7 Historisk utvikling 2003–2008

De eldste registreringene har vi fra et norsk røykeri som utførte registreringer av all laksen de fikk inn til prosessering (superior laks fra lokaliteter langs norskekysten). Registreringene viser at forekomsten av mørke flekker økte betydelig i perioden 2003–2008, fra 7 % til 20 % (Figur 14). Blodflekker viste ingen systematisk endring i perioden (variasjon 2 %–9 %). Røykeriet utførte også registreringer av ørret. Resultatene viste at forekomsten for ørret slaktet i perioden 2006–2008 lå på 3,7 % i gjennomsnitt (0–6 %). Årsaken til de noe høyere forekomstene sammenlignet med resultatene fra 2011–2015 kan skyldes området der ørreten ble oppdrettet.

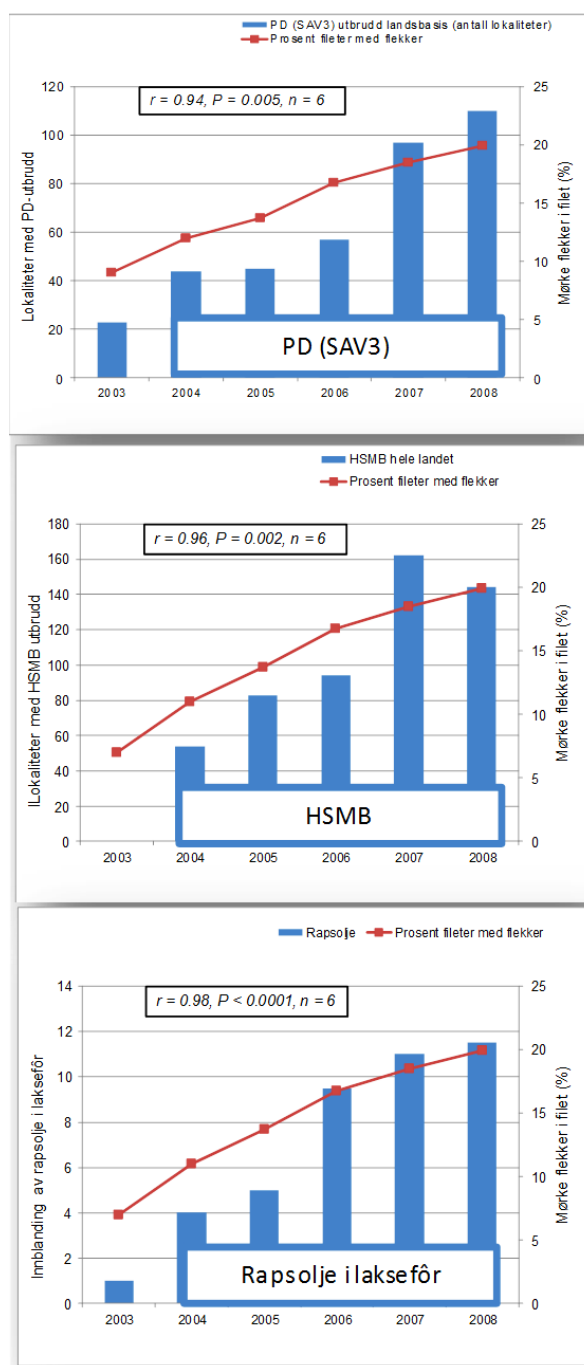


Fileter med flekker per parti prosessert, %



Figur 14 Andelen laksefileter med mørk pigmentering per parti ved et norsk røykeri perioden 2003–2008. I 2003 var det vanlig at røykeriet fikk inn partier med svært lite mørkpigmentering (under 4 % av filetene). Figuren til høyre viser gjennomsnittlig forekomst per år for mørke flekker (melanin) og blodflekker. Registreringer av ca. 1 million fileter i perioden.

Det er interessant å se på hva som skjedde i perioden 2003–2008 for å peke på faktorer som kan ha bidratt til den uheldige utviklingen med mørke flekker i laksefilet. I denne perioden var det en markert økning av HSMB og PD-utbrudd og det var også i 2003 man for alvor begynte å blande rapsolje i fôret til laks. Som det fremgår av Figur 15, er det sterk korrelasjon mellom økt forekomst av mørke flekker i laksefilet og hver av faktorene: utbrudd av HSMB, utbrudd av PD, økt innblandingsnivå av rapsolje i laksefôret på årsbasis. Det betyr at alle disse faktorene viser en sterk sammenheng til utviklingen av mørke flekker og at det ikke er mulig å peke på betydningen av dem enkeltvis. En signifikant korrelasjon sier nødvendigvis ikke noe om årsak-virkning, men det kan være verdt å se nærmere på disse faktorene.



Figur 15 Sammenheng mellom forekomst av mørke flekker og utbrudd av a) PD, b) HSMB og c) innblandingsnivå av rapsolje i laksefôr for perioden 2003–2008.

Tabell 4 Oppsummering som viser effekt av ulike faktorer for forekomst av mørke flekker undersøkt basert på registreringene ved prosessanlegg (250.000 enkeltregistreringer).

Faktor	Nei	Kanskje	Ja	Kommentar
Bedøvelse (slag/elektrisitet)	X			El-bedøvelse ved slakt kan i noen tilfeller gi blødninger i filet, men ikke melanin
Slaktefisk, størrelsesklasse	X			Effekt av størrelse kan være tydelig innen et parti. I noen tilfeller er forekomsten høyest for den største laksen, ved andre tilfeller den minste laksen
Vaksine	X			Graden av mørkpigmentering/respons på betennelse varierer noe mellom vaksineprodusenter
Avlusing		X		Mange avlusinger kan øke forekomsten
Transportdistanse til slakteri		X		Lang transportavstand til slakteri kan påvirke forekomsten, men generelt svak sammenheng.
Temperatur i sjø		X		Effekt av temperatur kun i enkelttilfeller (brå temperaturøkning vist sammenheng med økt melanisering)
Ventemerd		X		I enkelttilfeller negativ effekt av lang oppholdstid i ventemerd
Geografi			X	Betydelig lavere forekomst i Nord-Norge enn i Sør og Midt-Norge*
Sykdom		X	X	Risikoen for problematiske flekker øker etter PD-utbrudd, spesielt om utbruddet skjer tett opp til slakting. Det er sterk mistanke om at HSMB øker risikoen, muligens også CMS.
Kvalitetsklasse			X	Produksjonsfisk (bedømt utvendig) noe høyere forekomst av mørke flekker i filet
Vaksinering			X	Generelt høyere forekomst ved maskinvaksinering
Økologisk produksjon			X	Generelt lavere forekomst ved økologisk produksjon

*Sør og Midt-Norge: Sør-Trøndelag og sørover. Nord-Norge: Nord-Trøndelag til Troms.

3.8 Konklusjon og oppfølging

- Registreringer ved filetanlegg viser at problemet med mørke flekker i oppdrettslaks har økt betydelig i senere år
- Andelen fileter med mørke flekker er høyere i Sør og Midt-Norge (24 %) enn i Nord-Norge (13 %)
- Betydelig variasjon mellom lokaliteter. Ingen lokaliteter med frekvens under 7 % over tid. Noen lokaliteter har en generell forekomst på over 25 %
- Mørke flekker sitter hovedsakelig i fremre delen av buken
- Store ryggflekker er et økende problem, spesielt i Nord-Norge
- Færre og svakere flekker i økologisk produsert laks sammenlignet med konvensjonell laks
- Maskinvaksinert laks høyere forekomst enn håndvaksinert
- Risikoen for problematiske flekker øker etter PD-utbrudd, spesielt om utbruddet skjer tett opp til slakting. Avtakende forekomst av mørke flekker nordover sammenfallende med avtakende utbrudd av PD og CMS men betydningen av sykdom for utviklingen av mørke flekker er fortsatt uklar

Registreringene ved filetanlegg gir pålitelig informasjon om utvikling av mørke flekker og muligheten til å peke på generelle trender og faktorer å fokusere på for å få ned forekomsten gjennom målrettede tiltak.

Mange forhold varierer i praktisk oppdrett (f.eks. miljø, smittepress, fôr/driftsforhold), hvilket betyr at vi trenger store datamengder for å kunne trekke ut relevant informasjon fra kommersiell drift. I dag

har databasen nådd et nivå der det begynner å bli mulig å trekke ut relevante faktorer. For eksempel peker registreringene på:

- Behov for å forstå den betydelige geografiske gradienten for forekomsten av mørke flekker
- Behov for å forstå betydningen av sykdom/smittestoffer for utviklingen av mørke flekker
- Optimalisere vaksineringsmetodene av laks, herunder undersøke typer av utstyr og bruk av utstyr (f.eks. stikkpunkt og trykk ved vaksineringen)
- Fange opp endringer tidlig, f.eks. den urovekkende økningen av mørke rygger, spesielt i Nord-Norge
- Skaffe verdifull kunnskap ved å finne kjennetegn for lokaliteter og driftsformer med generelt lave forekomster

4 Forsøkene i prosjektet, Materiale metode

Forfatter: Turid Mørkøre

4.1 Karakterisering av mørke flekker

Fiskematerialet som ble benyttet for å undersøke kjennetegn for mørke filetflekker var enten 1) laks fra filetanlegg, 2) laks fra en avlspopulasjon, 3) laks fra føringforsøk i prosjektet

1) Laks fra filetanlegg

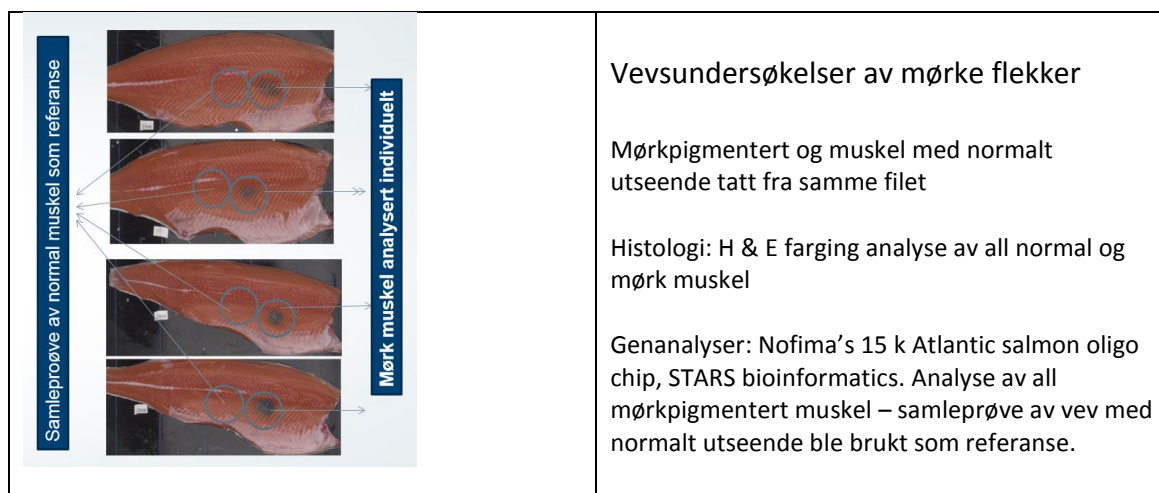
Kvalitetskontrollør tok ut tilfeldige fileter fra filetlinjen med små og store bukflekker samt fileter med ryggflekker. Filetene ble tatt fra filetlinja i tre omganger, fra to prosessanlegg (Tabell 5). Mørkpigmentert muskel og nærliggende normal muskel ble analysert for kjemiske og fysiske kjennetegn: kjemisk sammensetning, pH, tekstur, spektroskopi og nivå av melanin.

Tabell 5 Oversikt over fileter benyttet til undersøkelse av kjennetegn for mørke flekkene.

	10/12-2012	18/6-2013	27/6-2013
Fileter med score 1-2 i bukpartiet	5	5	5
Fileter med score 4 i bukpartiet	5	5	5
Fileter med flekk i ryggen	2	4	5

2) Laks fra avlspopulasjon

Laks ble selektert fra en avlspopulasjon i et forsøk (SalmoBreed årsklasse 2011, testslakt 02.2013 Averøy). Laksen ble bløgget og filetert umiddelbart etter avliving og sløyning, og fileter ble valgt ut til analyse basert på mørke flekker i bukområdet. Filetene ble fotografert og mørkt muskelvev ble lagt i formalin for histologiske analyser (H & E farging) og konservert (RNA-later) for senere genanalyser. Genuttrykk ble analysert ved microarray; Nofima's 15 k Atlantic salmon oligo chip, STARS bioinformatics (Figur 16). Normalt vev fra de samme filetene ble benyttet som referanse (samleprøve). For å undersøke om avl for økt motstandsevne mot sykdommene IPN og PD påvirker deponering av melanin, sammenlignet vi grad av mørke flekker for 20 familier fra det samme familiematerialet. Familiesnitt for mørke flekker og familieoverlevelse i IPN-test og PD-test ble undersøkt.



Figur 16 Vevsundersøkelse av flekker ved histologi og microarray (12 fileter).

3) Laks fra fôringsforsøk i prosjektet

Vi gjennomførte to store fôringsforsøk i prosjektet der vi fulgte laks fra yngelstadiet frem til slakt. I tillegg til å undersøke effekt av fôr og driftsformer, benyttet vi dette fiskematerialet til å undersøke kjennetegn for mørke flekker med vekt på utvikling over tid, patologi og en nærmere beskrivelse av bl.a. flekkenes plassering. En nærmere beskrivelse av forsøkene er gitt i avsnittet nedenfor.

4.2 Fiskeforsøk

To basispopulasjoner med henholdsvis ettårssmolt og nullårssmolt ble fulgt gjennom hele livssyklusen i prosjektperioden. Begge fiskegruppene kom fra Nofimas ferskvannsstasjon på Sunndalsøra og fisken ble oppdrettet i sjø ved Nofimas sjøvannsstasjon på Averøy (senere overtatt av Marine Harvest Fish Feed). Både i ferskvann og sjø ble fisken fôret til metning og overskuddsfôr ble oppsamlet (Einen *et al.*, 1999). Fôrene ble undersøkt for recovery og tørrstoff (Helland *et al.*, 1996). Vekt av overskuddsfôr ble korrigert for vannopptak. Fôrtyper som ble benyttet i forsøket og uttakstidspunkt for analyse av fisk er vist i Tabell 7.

For å undersøke om dannelsen av mørke flekker påvirkes av fôret, valgte vi å tilsette fôret sink, vitamin E, vitamin C, selen som potensielt hemmere av melanisering, og kobber og mykotoksinet DON som potensielt fremmere av mørkpigmentering. Forsøkene ble gjennomført med vaksinert og uvaksinert laks.

4.2.1 Forsøk ettåring

Forsøket hadde oppstart 20.03.2013 med 6765 laks (Aquagen avstamning; lysstyring 12:12). Laksen fikk tre ulike fôr: kontrollfôr eller det samme fôret tilsatt ekstra vitamin E eller sink (2 kar per fôrtype). Den 04.04.2013 ble laksen injisert med saltvannsløsning (1 % NaCl, omtalt som uvaksinert) eller vaksine med en 6-komponent vaksine fra MSD Animal Health (Norvax Minova 6); 0,1 ml dose, mineralolje adjuvans, med beskyttelse mot furunkulose, vibriose (O1, O2), kaldtvannsvibriose, vintersår (*Moritella viscosa*) og infeksjøs pankreas nekrose, IPN (sub unit VP2 av IPN virus), immunitet etter 500 døgngrader. Fisken veide minimum 35 g ved vaksinerings og sultetiden før vaksinerings var 3 dager. Laksen ble håndvaksinert. Vaksinert og uvaksinert laks ble oppdrettet sammen for å undersøke hypotesen om at vaksinert laks har mer flekker i filet enn uvaksinert laks. For å kunne skille mellom fiskegruppene, ble den uvaksinerte laksen fettfinneklipt. Salttest ble utført 21.05-27.05.2013 (3 tester). Laksen ble transportert fra Sunndalsøra til Averøy (tanker på bil), der den ble overført i 5 nøter. Laksen veide i gjennomsnitt 69.6g. Gjennomsnittstemperaturen i ferskvannsfasen var 7.2°C (SD 0.97).

Vaksinert og uvaksinert laks fra kontrollgruppen ble fordelt i tre 125 m³ nøter i sjø 29. mai 2013 (Averøy forsøksstasjon). Vaksinert laks fra sinkgruppen ble fordelt i to nøter. Laksen i disse nøtene fikk de samme fôrbehandlingene gjennom hele forsøket (mars 2013–august 2014). Juni 2014 ble laks fra kontrollnøtene splittet i 12 nøter (125 m³) og gitt kontrollfôr (3 nøter) eller det samme fôret tilsatt kobber (3 nøter), vitamin E og organisk selen (3 nøter) eller sink (3 nøter) (Figur 17). En oversikt over kontrollfôret og tidspunkt for fôrbytte gjennom forsøket er vist i Tabell 7. Laksen ble fôret til metning og karene/nøtene var utstyrt med fôroppsamling. Temperaturen i sjøen ble registrert daglig (3m). Laksen ble slaktet uke 34 i august 2014 i henhold til standard slakteprosedyre (bedøvd MS222, gjellekuttet) eller etter trenging i 2 minutter i hov. Noe laks ble ikke tatt opp av noten men holdt videre i 4 uker sammen med laks som var trengt og gjellemerket.

Forsøksdesign, 12 nøter

BLOCK 1		BLOCK 2		BLOCK 3	
F1	F3	F5	F7	F9	F11
Cu	AntiOx	Contr	Zn	Zn	Cu
number 140	number 140	number 140	number 140	number 140	number 140
biomass 346	biomass 349	biomass 347	biomass 342	biomass 346	biomass 344
weight (kg) 2.47	weight (kg) 2.49	weight (kg) 2.48	weight (kg) 2.44	weight (kg) 2.47	weight (kg) 2.46
F2	F4	F6	F8	F10	F12
Contr	Zn	Cu	AntiOx	Contr	AntiOx
number 140	number 140	number 140	number 140	number 140	number 140
biomass 348	biomass 343	biomass 351	biomass 351	biomass 350	biomass 348
weight (kg) 2.48	weight (kg) 2.45	weight (kg) 2.51	weight (kg) 2.51	weight (kg) 2.50	weight (kg) 2.49

Figur 17 Forsøksdesign for ettåringen i perioden før slakt (juni–august 2014).

4.2.2 Forsøk nullåring

Forsøket hadde oppstart 04.07.2013 med 3420 laks med en gjennomsnittsvekt på 17 gram (Aquagen avstamning). Laksen ble holdt ved henholdsvis 8,5 og 16 grader (2 kar per temperatur) frem til 26.09.2013 da den ble overført i sjøvann. Vaksinerings ble foretatt 08 og 09.08.2013. Laksen ble da injisert med saltvannsløsning (1 % NaCl, omtalt som uvaksinert) eller en 6-komponent vaksine fra MSD Animal Health (Norvax Minova 6; se beskrivelse ovenfor). Ved vaksinerings veide laksen holdt ved 8,5 °C 26 gram (kf 1,23 – 16 % av laksen hadde gjelleforkortelse) mens laksen holdt ved 16 °C veide 40 gram (kf 1,32 – 0 % av laksen hadde gjelleforkortelse).

Det vil si at forsøket omfattet fire fiskegrupper (all fisk var PIT-tag merket i juli):

- Vaksinert 8 °C, 872 laks
- Uvaksinert 8 °C, 857 laks
- Vaksinert 16 °C, 920 laks
- Uvaksinert 16 °C, 767 laks

Laksen ble fordelt i to 7X7X7m nøter på Marine Harvest forsøksstasjon 26.09.2013, Averøy, der den fikk standardfôr frem til januar 2015. På det tidspunktet fikk laksen enten et kontrollfôr (se Tabell 7), det samme fôret tilsatt antioksidanter (vitamin E, vitamin C og selen), eller mykotoksinet DON. I tillegg hadde vi ett magert fôr (16 % fett) med høyt innhold av vitamin E (500 mg/kg) og C (1000 mg/kg) (Skretting, Vitalis Røye). Dette fôret fikk vi dessverre ikke til å fungere pga flyteegenskaper, og resultatene vil ikke bli presentert. Kontrollfôret og Antioksidant fôret ble gitt til triplikate 125 m³ nøter med stigende tetthet: lav tetthet (60 fisk/not), middels tetthet (120 fisk/not), høy tetthet (350 fisk/not). Tetthetene i kg/m³ kan ikke direkte sammenlignes med de i kommersiell oppdrett på grunn av formen og størrelsen på nøtene. DON fôret ble gitt en not med lav tetthet (kun vaksinert laks). All laks ble slaktet uke 17–19. mars 2015 ved bruk av standard slaktemetode. Oversikt over forsøksoppsettet er gitt i Tabell 6.

Tabell 6 Forsøksdesign for nullåringen i perioden før slakt (6. januar–16. mars 2015). Gjennomsnittsvekten ved oppstart var 3,6 kg.

Tetthet i merd	Behandling ferskvann	Fôr			
		Kontrollfôr	Antioksidant (Vit E & C, Se)	Magert fôr /reduisert fôring	Mykotoksin fôr
Lav tetthet	Vaksinert 8°C	x	x	x	x
	Vaksinert 16°C	x	x	x	x
	Uvaksinert 8°C	x			
	Uvaksinert 16°C	x			
Middels tetthet	Vaksinert 8°C	x(M)	x(M)	x(M)	
	Vaksinert 16°C	x(M)	x(M)	x(M)	
	Uvaksinert 8°C	x			
	Uvaksinert 16°C	x			
Høy tetthet	Vaksinert 8°C	x(O2)	x(O2)	x(O2)	
	Vaksinert 16°C	x(O2)	x(O2)	x(O2)	
	Uvaksinert 8°C	x			
	Uvaksinert 16°C	x			

(M) indikerer laks som ble injisert med mykotoksinet DON. (O2) indikerer laks som ble holdt i vann med lavt oksygen

4.2.3 Fôrene i forsøkene

Det er mistanke om at blødninger kan føre til deponering av mørke pigmenter i fileten, for eksempel ved ribbeinsbrudd eller brister i åreveggene. Det er kjent at visse komponenter i fôret kan påvirke blødningstendenser i muskel og andre vev og laks som er i ernæringsmessig ubalanse kan ha forstyrret blodlevring og økt tendens til blødning i muskel. Fôret har dessuten stor betydning på fiskens evne til å takle infeksjoner og helingsevne. De senere årene har det vært mye fokus på å forstå sammenhengen mellom næringsstoffer i maten og melaninsyntese i mennesker. Denne kunnskapen kan vi nyttiggjøre oss av. Hovedformålet i prosjektet var å finne ut om fôrsammensetningen påvirker melanisering av laksemuskel. Derfor valgte vi å undersøke komponenter som eventuelt kan hemme deponeringen av mørke pigmenter (sink, selen, vitamin E, vitamin C), eller eventuelt fremme deponeringen (kobber, soppgiften DON: deoksynivalenol).

1) Kontrollfôr

I fôringsforsøkene brukte vi standard kommersielt fôr (se Tabell 7)

2) Sink

Sink er viktig for styrken av åreveggene og marginal mangel kan gi blødningstendenser og hjertekarproblemer. Sink er dessuten viktig for sårheling, et velfungerende immunforsvar, normal omsetning av næringsstoffer og normal skjelettutvikling. Det er spesielt viktig å sikre tilstrekkelig sinkinnhold i fôret i perioder med rask vekst (og lav retensjon), ved infeksjoner eller fysisk aktivitet/stress. Grenseverdien for største tillatte innhold av sink i fôr til oppdrettslaks er 200 mg/kg, og foreslått redusert til 150 mg/kg. Det er påvist tidvis underdekning av sink i kommersielt oppdrettsfôr.

Sinkfôr i forsøkene:

- En gruppe ettåringen fikk fôr med ekstra tilsetning av 100 mg sink gjennom hele produksjonen, fra mars 2013 til august 2014.
- En gruppe ettåring fikk kontrollfôr frem til juni 2014, og deretter fôr tilsatt 100 mg sink fra juni til august 2014.

Kilde sink: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. (Kontrollfôr 129 mg/kg i Optiline 9mm, 134 mg/kg Spirit 7mm [BioLab, Bergen]).

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/z4750?lang=en®ion=NO>

3) Antioksidanter (Vitamin E, vitamin C og selen)

Vitamin E er en sterk antioksidant som har mange gunstige effekter i dyreceller. Bl.a. er vitamin E viktig for et velfungerende sykdomsforsvar og kan hemme blødningstendenser. Vi har tidligere vist (2011, FHF/NFR prosjekt) at økte nivåer av vitamin E i fôret til laks i perioden frem til slakting gjorde laksen mer robust, ga bedre tarmhelse og også bedre muskelfasthet. Deponering av melanin i muskel kan skje som en reaksjon på betennelsestilstander i fisken, men det er ikke kjent om vitamin E nivået i fôret hemmer betennelse eller påvirker melanindeponering.

Selen er et essensielt sporstoff og flere selenoproteiner er viktige for proteinenes funksjon. Selen er viktig for å vareta den oksidative balanse og for å motstå fysiologisk stress. Selen er ikke en antioksidant i seg selv, men spiller en vesentlig rolle i kroppens viktige antioksidant system, glutathione peroxidase (GPx), som arbeider sammen med E-vitamin. Det er også en nær sammenheng mellom GPx og syntesen av melanin. Det er sterke indikasjoner på at lavt GPx nivå stimulerer melaninsyntese. Nesten alle fiskefôr som brukes i Norge i dag overstiger, ifølge Nifes, EU-forskriften og den aktuelle nasjonale forskrift om total selen (Se) i fiskefôr (0,5 mg / kg fôr).

C-vitamin er en potent antioksidant, som sammen med vitamin E bidrar til å nøytralisere angrep mot kroppen som kan skade celler, proteiner og arvestoff. Vitamin C bidrar til immunsystemets normale funksjon, fettforbrenning og bindevevsdannelse, og vitaminet er nødvendig for god sårtilheling. Fysisk stress øker utskillelsen av vitamin C. Syntesen av melanin hemmes av vitamin C (hemmer tyrosinase). Visse fettyper stimulerer syntesen av melanin (18:3 n-6).

Innblanding av antioksidanter i fôret i prosjektet

- a) En gruppe ettåring fikk fôr tilsatt 300 mg/kg vitamin E i ferskvannsfasen
- b) En gruppe ettåring fikk kontrollfôr frem til juni 2014, og deretter kontrollfôr tilsatt 500 mg/kg vitamin E + 0.2 mg/kg organisk selen fra juni til august 2014.
- c) En gruppe nullåring fikk kontrollfôr frem til januar 2015, og deretter kontrollfôr tilsatt 500 mg/kg vitamin E, 0.2 mg/kg selen og 350 mg vitamin C.

Kilde vitamin E: dl- α -tocopheryl acetate – DSM Nutritional Products Ltd, Basel, Switzerland (Kontrollfôr 200–300 mg/kg)

Kilde vitamin C: ROVIMIX® STAY-C®35, DSM Nutritional Products Ltd, Basel, Switzerland

Kilde organisk selen: Organisk selen Sel-Plex®, Alltech (Produx) (maks tillatt grense organisk selen 0,2 mg/kg, tillatt grense for selen totalt 0,5 mg/kg). Mengden selen i produktet ble analysert til å være 2900 mg/kg ved Eurofins Norsk Matanalyse Moss. Ifølge EFSA 2011, inneholder produktet 2000–2400 mg Se/kg (97–99 % organisk selen). Organic selen er hovedsakelig selenometionin (63 %) og selenkomponenter med lav molekylvekt selenocomponents (34–36 %).

<http://www.alltech.com/product/sel-plex>

http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2110.pdf

4) Kobber

Kobber er viktig for funksjonen til en rekke enzymer, og er innblandet i syntese av bindevev, jernmetabolismen, energiproduksjon, immunfunksjon og nervesystemet. Kobber har vist seg å ha betydning for avleiring av melaninpigmenter i åreveggene hos torsk. Det er ikke kjent om forhøyet kobbernivå i fôret til laks fører til økt melanisering, men vi har sett at melaninpigmenter ofte er konsentrert rundt blodårene i bukområdet. Tyrosinase er et kobberavhengig enzym som katalyserer produksjonen av melanin og det er vist at tilsetning av kobber til proteinekstrakter fra fiskemuskel øker tyrosinase aktiviteten (Cooper og Midling 2007).

Kobbertilsetning

- a) En gruppe ettåring fikk kontrollfôr frem til juni 2014 og deretter kontrollfôr tilsatt 12 mg/kg kobber fra juni til august 2014.

Kilde kobber: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Kobber(II) sulfat pentahydrat AnalAR NORMAPUR[®] ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. Analytisk reagens (VWR Chemicals) (kobber i kontrollfôr 9,1 mg/kg; maks tillatt grense 25 mg/kg oppgitt for kobber-chelat med innhold på minst 18 % Cu og di-kobber-klorid med minst 55 % Cu)

1) Deoksynivalenol (DON)

DON er et mykotoksin som produseres av visse sopper av *Fusarium* slekten. *Fusarium* er en stor soppsekt med mange arter som angriper korn og diverse kulturplanter. Soppene overlever på planterester, i jord og på frø/såkorn. De siste årene har bruken av planteproteiner vært økende og derved også risikoen for forurensning av mykotoksiner (giftstoffer fra muggsopp). 8 mg/kg er anbefalt øvre DON-innhold i kornråvarer til fôrproduksjon. Melanin er kjent for å binde giftige forbindelser.

Innblanding av DON i fôret

- a) En gruppe nullåring ble fôret med kontrollfôr frem til februar 2015 og deretter gitt fôr innblandet kjemisk fremstilt DON. Fôringsperioden var 4 uker. Innholdet av DON ble analysert til 7,3 mg/kg DON i ferdig fôr (Veterinærinstituttet)
- b) Væske med innblandet kulturmedium fremstilt DON ble benyttet til tvangsfôring, injisering i bukhulen eller injisering i muskulaturen. Fysiologisk saltvann ble benyttet som kontroll. Laksen ble merket og gitt standardfôr etter behandlingen, fra januar – mars 2015 (8 uker).

Kilde deoksynivalenol (DON): Kjemisk fremstilt DON Int'l Business Dept. Nanjing Chemlin Chemical Industry Co.,Ltd: 1-[2-CHLORO-6-[[[3-IODOPHENYL]METHYL]AMINO]-9H-PURIN-9-YL]-1-DEOXY-N-METHYL-BETA-D-RIBOFURANURONAMIDE (Figur 18).

Topp-coating av pellet med deoksynivalenol (DON) (Nofima, Titlestad)

Konsentrasjoner av DON i forsøket: 500 mg/kg DON i stukk-løsning. Det ble laget en stukk-løsning av 425 mg DON løst opp i 800g etanol + 400g vann. Etter coating ble fôret (Skretting, Optiline V) lagt til tørk på brett.

Nanjing Chemlin Chemical Industry Co., Ltd.
 Rm 502, Longyin Plaza, No.217 Zhongshan Rd (N), Nanjing, China
 Tel: +86 25 83697070, Fax: +86 25 83453276
 Web-Site: www.chemlin.com.cn

Date: Jan 22, 2015

Certificate of Analysis

We hereby certify that the above product was analyzed with following results

Product Name:	1-[2-CHLORO-6-[3- (3,4-DIPHENYL-1-METHYLAMINO)-9H- PURIN-9-YL]-1-DEOXY-N-METHYL- BETA-D-RIBOPURANURONAMIDE]	CAS NO.:	163042-96-4
Molecular Formula:	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₈ O ₄	Constitutional Formula:	
Molecular Weight:	544.73		
Batch No.:	20140321		

Inspect Item	Results
Appearance	White solid
Assay	98%
Conclusion	Passed

Quality Management System Certificate
 Tel: 025-83697070
 Fax: 025-83453276

Nanjing Chemlin Chemical Industry Co., Ltd.
 Rm 502, Longyin Plaza, No.217 Zhongshan Rd (N), Nanjing, China
 Tel: +86 25 83697070, Fax: +86 25 83453276
 Web-Site: www.chemlin.com.cn

Date: Jan 22, 2015

Certificate of Analysis

We hereby certify that the above product was analyzed with following results

Product Name:	1-[2-CHLORO-6-[3- (3,4-DIPHENYL-1-METHYLAMINO)-9H- PURIN-9-YL]-1-DEOXY-N-METHYL- BETA-D-RIBOPURANURONAMIDE]	CAS NO.:	163042-96-4
Molecular Formula:	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₈ O ₄	Constitutional Formula:	
Molecular Weight:	544.73		
Batch No.:	20150116		

Inspect Item	Results
Appearance	Gray to off white solid
Assay	80%
Conclusion	Passed

Quality Management System Certificate
 Tel: 025-83697070
 Fax: 025-83453276

Figur 18 Analysesertifikat som viser egenskapene til mykotoksinet deoksynivalenol (DON) som ble benyttet i fôringsforsøket med nullåringen (renhetsgrad henholdsvis 98 % og 80 %).

Kulturmaterial DON fra Romer Labs, Tulln, Østerrike (8225 mg/kg DON) ble benyttet ved tvangsfôring og injisering bukhule og muskel. Alle fôr ble toppcoatet med rapsolje for å unngå smaksforskjeller mellom fôrene.

Grenseverdier for fôrtilsetningsstoff, se Lovdata: <http://lovdata.no/static/SF/sf-20050412-0319-02-33.pdf>

Tabell 7 Fôrene som ble benyttet i forsøkene med ettåringen og nullåringen samt tidspunkt for uttak av fisk til analyse i forsøksperioden.

Tidspunkt	Fôr	Uttak av fisk til analyse Kvalitet og helse
ETTÅRING		
Mars 2013	Nutra Olympic 3.0	x
April 2013	-	x
Mai 2013	-	x
Juni 2013	Spirit ST 3mm	x
August 2013	Spirit PL ST 4.5mm	x
Oktober 2013	Spirit Pluss 7mm	x
Januar 2014	Optiline V 9mm	x
Mars 2014	-	x
Juni 2014	Optiline Premium 2500, 9mm	x
August 2014	-	x
September	-	x
NULLÅRING		
Oktober 2013	Spirit PL ST 3mm	x
Desember 2013	-	x
Januar 2014	Spirit V 150 4,5mm	x
Mars	-	x
April 2014	Spirit V 600, 7mm	x
Juli 2014	Optiline Premium 2500, 9mm	x
September 2014	-	x
Desember 2014	Optiline V 2500 40A, 9mm	x
Januar 2015	-	x
Mars 2015	-	x

Alle fôrene var produsert av Skretting

5 Resultater – karakterisering av mørke flekker

Forfattere: Turid Mørkøre, Thomas Larsson, Magnus Åsli, Helena Moreno, Hooman Moghadam, Erling-Olaf Koppang, Karsten Heia, Jacob S. Torgersen, J.A. Borderias, Aleksei Krasnov

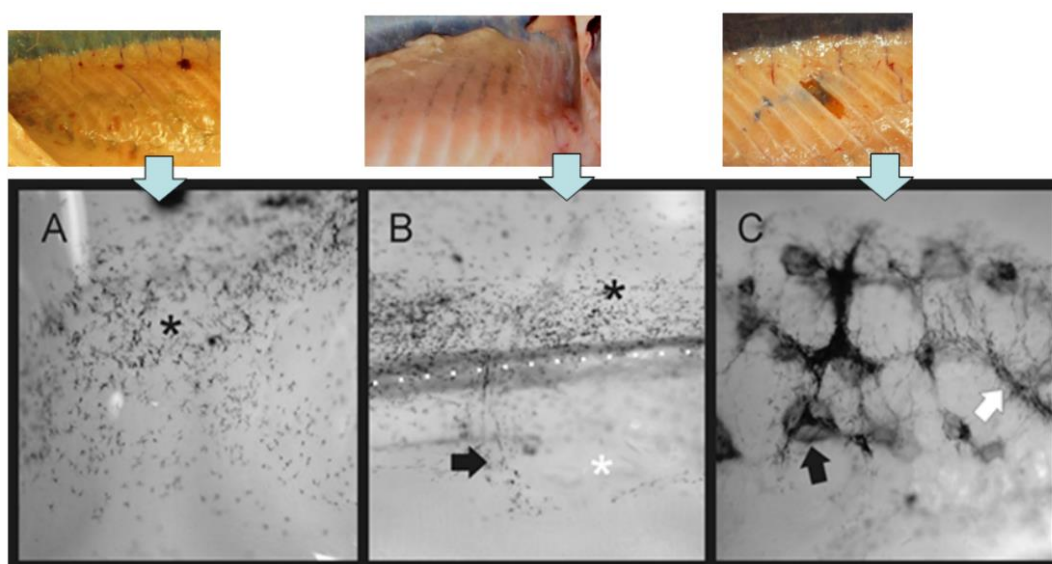
Graden av misfarging varierer betydelig mellom fileter, fra små grå nærmest usynlige skygger til store svartpigmenterte områder. Mørke flekker synes å forekomme like ofte på høyre og venstre side.

Melanisering av bukhinnen (Figur 19) og melanisering av filet synes å være forskjellige egenskaper. Det er normalt at bukhinnen hos yngel har små melaninprikker, jevnt fordelt over hele bukhinnen, mens melaniserte flekker i muskel først utvikles i sjø. I våre forsøk observerte vi flekker i filet når laksen veide ca. ½ kilo. Forekomsten av store mørke flekker i ryggen har økt senere år, likeledes mørkpigmentering av den brune muskelen under skinnen. Vi har kun sett mørkpigmenterte rygger (Figur 22) og melanisert mørk muskel under skinnen hos slaktefisk.

5.1 Utseende og mikroskopi

Bukhinne

Hos slaktefisk kan hele bukhinnen være svakt eller kraftig pigmentert, eller så kan pigmenteringen være konsentrert langs ribbeina (Figur 19). Filetkvaliteten vil ikke være påvirket dersom mørkpigmenteringen er begrenset til bukhinnen, siden den fjernes når ribbeinene trimmes bort (Figur 20). Flekker i muskulaturen sitter hovedsakelig rett innenfor bukhinnen i ribbeinsområdet, men muskulaturen kan være så kraftig pigmentert at det er synlig gjennom bukhinnen i sløyd fisk. Slik det fremgår av figuren nedenfor, er det mørke utseendet forårsaket av melanin som enten er spredt på overflaten av bukhinnen eller konsentrert som striper langs ribbeina og blodårer. Bildet lengst til høyre viser et nærbilde av melanisert muskel mellom to ribbein, med mange melanocytter som grupperer seg rundt muskelceller og som runde baller.

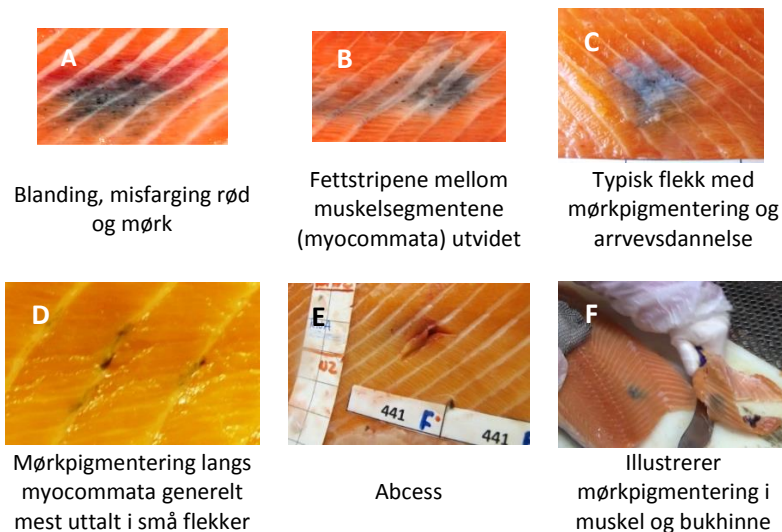


Figur 19 Mikroskopi av bukhole, overflateepitel og underliggende muskel. A) Spredte melanin positive celler på overflaten av bukhinnen (). B) Melanin positive celler (*) som striper over ribbeina (prikket linje) og melanocytter langs blodåre (pil). C) Muskelvev mellom to ribbein med mørk flekk. Et stort antall melanocytter som grupperer seg rundt muskelceller (hvit pil) og som runde baller (svart pil).*

Filetflekker

Visuell bedømmelse av flekker fra stort datamateriale på 3700 fileter (avlspopulasjon, avsnitt 11) viste at over halvparten av flekkene bestod kun av arrvev (ikke synlig blod eller melanin). Sirka en tredjedel av flekkene hadde en blanding av mørke pigmenter og arrvev (Figur 20 C) mens kun hver tiende flekk var brunsvart uten synlig arrvev (betegnet «melanin»). Hver tyvende flekk hadde synlig innslag av blod (Figur 23).

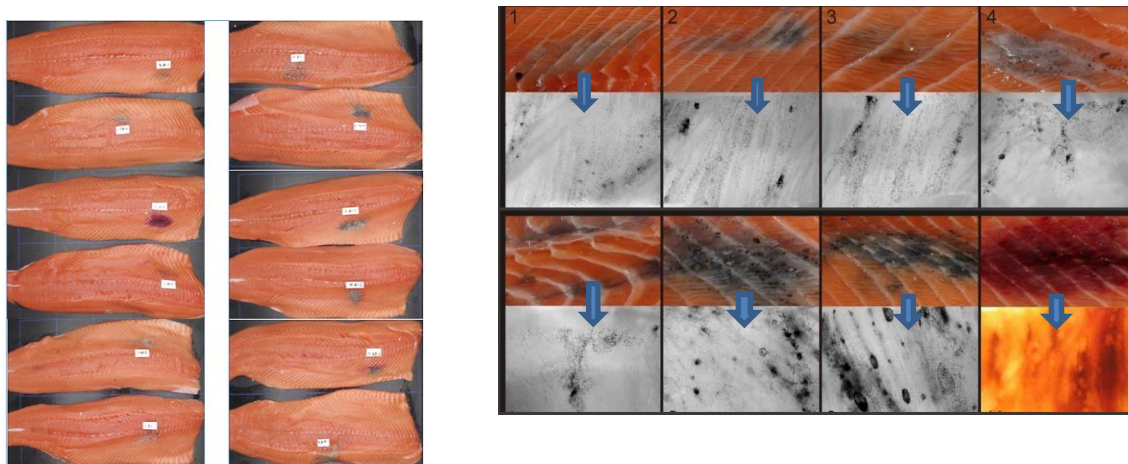
For små flekker er konsentrasjonen av mørke pigmenter ofte høyest langs skillet mellom muskelsegmentene (myocommata) og fettstripene mellom muskelsegmentene kan være forstørret. Ribbeina går langs skillet mellom muskelsegmentene og dette vevet er rikt på fett og bindevev. Mye tyder på at dette området er spesielt utsatt for mørkpigmentering og bør ha fokus i videre studier.



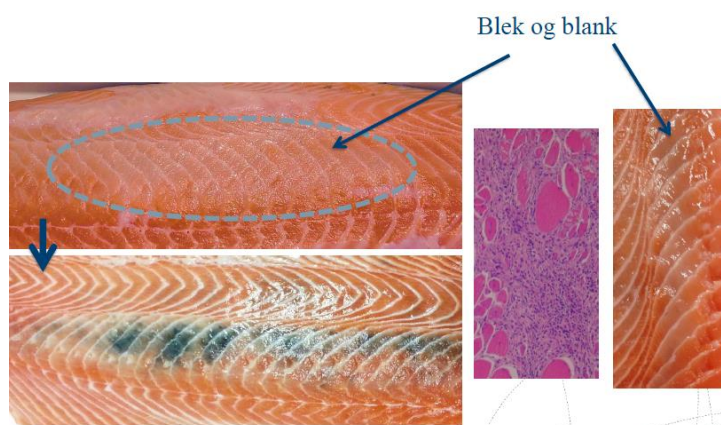
Figur 20 Illustrasjoner av mørk og rødfarget muskel

Melanisering av flekker med varierende mørkpigmentering ble undersøkt (Figur 21). Resultatene viste at mørke og dype flekker hadde mest melanin, som ses som mørke nøster på bildene. Det var blod som var en viktig årsak til den misfargede røde flekken. Det kan imidlertid ikke utelukkes at andre pigmenter enn melanin og blod bidro til misfarging (for eksempel lipofuscin).

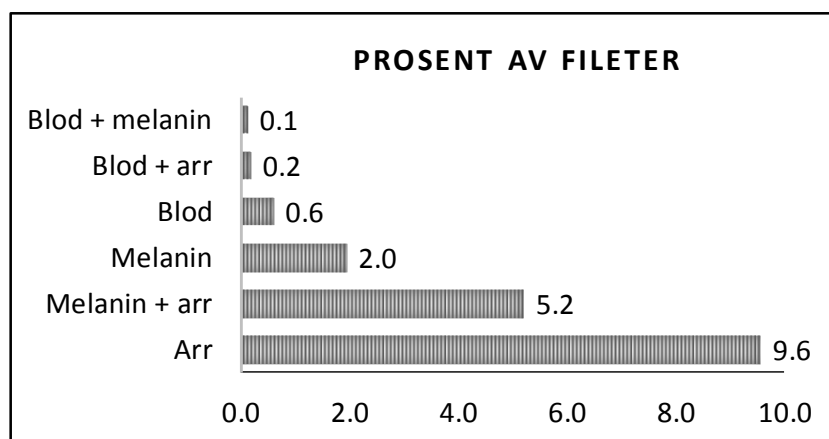
Mikroskopi av mørkpigmentert muskel i bukområdet (Figur 24) og ryggen (Figur 22) viste at flekkene kan knyttes til en betennelsestilstand, sannsynligvis sent utviklende. Likevel ser det ut til at histopatologiske forandringene kan variere mellom flekker siden noen av flekkene ikke viste tegn til betennelse mens andre flekker med tilsynelatende samme utseende hadde betydelige forandringer knyttet til både akutt og kronisk betennelse, opphopning av bindevev og muskeldegenerasjon (Figur 24). Det er også interessant at det ble påvist melanin i en helt rød flekk samt muskeldegenerasjon i muskelvev ved siden av flekkene.



Figur 21 Fileter med små og store flekker i bukområdet (område B1,B2).Bildene til høyre viser nærbilder av flekkene (blå pil). De mørke områdene i bildene er melanin.



Figur 22 Melanisert ryggmuskel. Figuren viser mulig forløp og histologisk bilde av den mørke ryggmuskelen.



Figur 23 Kategorisering av flekker basert på visuell bedømmelse av 3700 fileter. Laksen veide 4,7 kg i gjennomsnitt og 18% av filetene hadde mørke flekker.

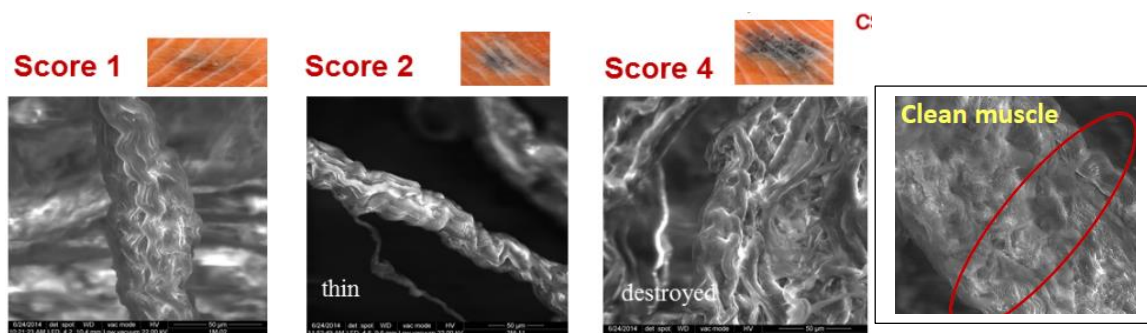
	VEV MED FLEKK							VEV UTEN FLEKK	
	Akutt betennelse	Kronisk betennelse	Fibrøs	Granulom	Muskel degenerasjon	Muskel regenerasjon	Melanin	Muskel degenerasjon	Muskel regenerasjon
	0	0	0	0	Lite	0	0	Lite	0
	0	0	0	0	Noe	Noe	0	Noe	Noe
	Ja	0	0	0	Ja	0	0	Lite	0
	Mulig	Mulig	Mulig	0	Mulig	Mulig	0	0	0
	0	Ja	Ja	Mulig	Mulig	Mulig	Ja	Lite	0
	0	Ja	Ja	Mulig	Ja	Mulig	Ja	na	na
	0	Ja	Ja	0	Ja	Mulig	Ja	na	na
	0	Ja	Ja	Ja	Ja	Mulig	Ja	na	na
	0	Ja	Ja	Ja	Ja	Mulig	Ja	Noe	0
	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Mulig	Ja	Noe	Noe
	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Noe	0
	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Noe	0

Figur 24 Filetene som ble benyttet til histologiske (H&E farging) og gen (microarray) analyser. Undersøkelsene ble gjort av misfarget muskel og normal muskel fra de samme filetene. Filetene i figuren er rangert etter grad av forandringer (histopatologiske forandringer). Laksen i undersøkelsen ble slaktet februar 2013 og gjennomsnittsvekten var 4,2 kg.

Bindevev

Bindevevsanalyser av mørke flekker viste unormal struktur i mørke flekker; dess mer mørkpigmentering, desto mer unormal struktur. Som det fremgår av Figur 25, hadde muskel med normalt utseende, tykke velorganiserte bindevevstråder, mens muskel med kraftig mørkpigmentering hadde bindevev som fullstendig manglet organisering (bindevevet fremstod som en «stor floke»). Det ble benyttet avansert metodikk for å få frem kjennetegnene for bindevevet i mørkpigmentert muskel (CT-fiber morfologi, Scanning Elektron Mikroskopi SEM, samt FTIR). Aminosyrene glysin (Gly), hydroksylisin (Hyl) og hydroksyprolin (Hyp) er viktige for stabiliteten av bindevevet. Kjemiske analyser viste at mørkpigmentert muskel hadde lavere innhold av disse aminosyrene.

Bindevev fra mørke flekker (50 μm)



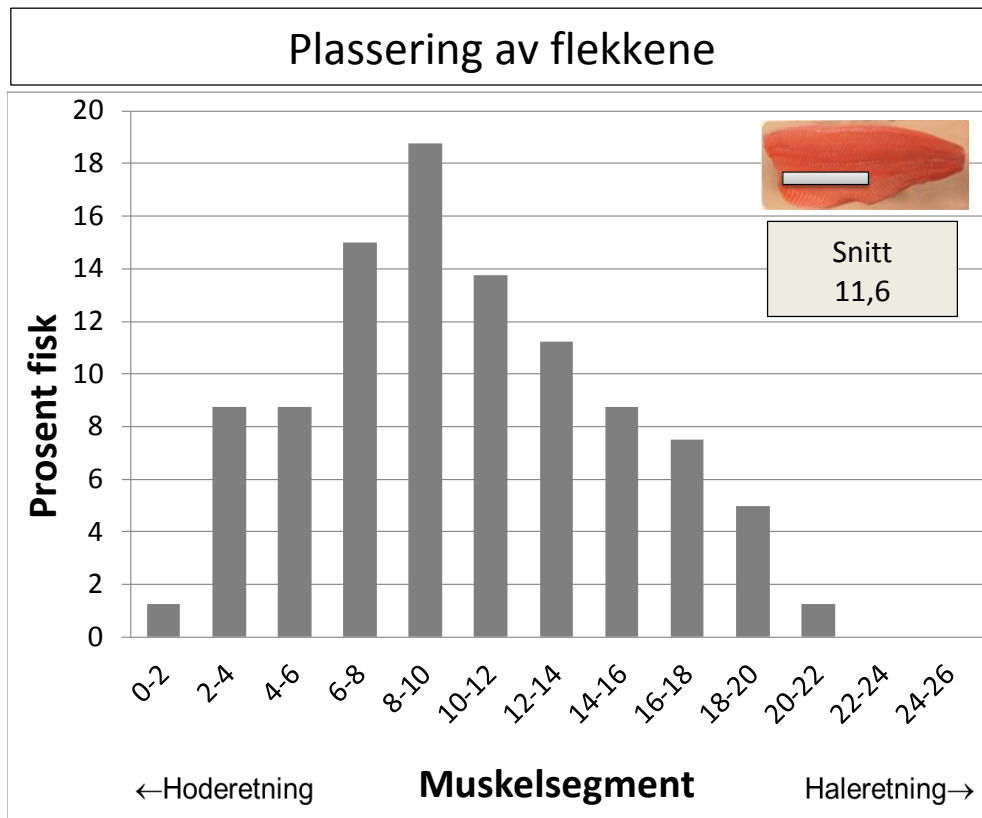
Figur 25 Bindevevsanalyser av flekker med varierende grad av mørkpigmentering. Mikroskopering viste at strukturen var betydelig forandret i mørkpigmentert muskel. Ved score 1. var bindevevstrådene tynnere enn i muskel med normalt utseende (lengst til høyre). Bindevevet i muskel med score 2 hadde enda tynnere og mer «flisete» bindevevstråder. Ved score 4 var bindevevet i oppløsning og uten den karakteristiske organiseringen (alle bildene har samme forstørrelse).

5.2 Plassering av flekkene

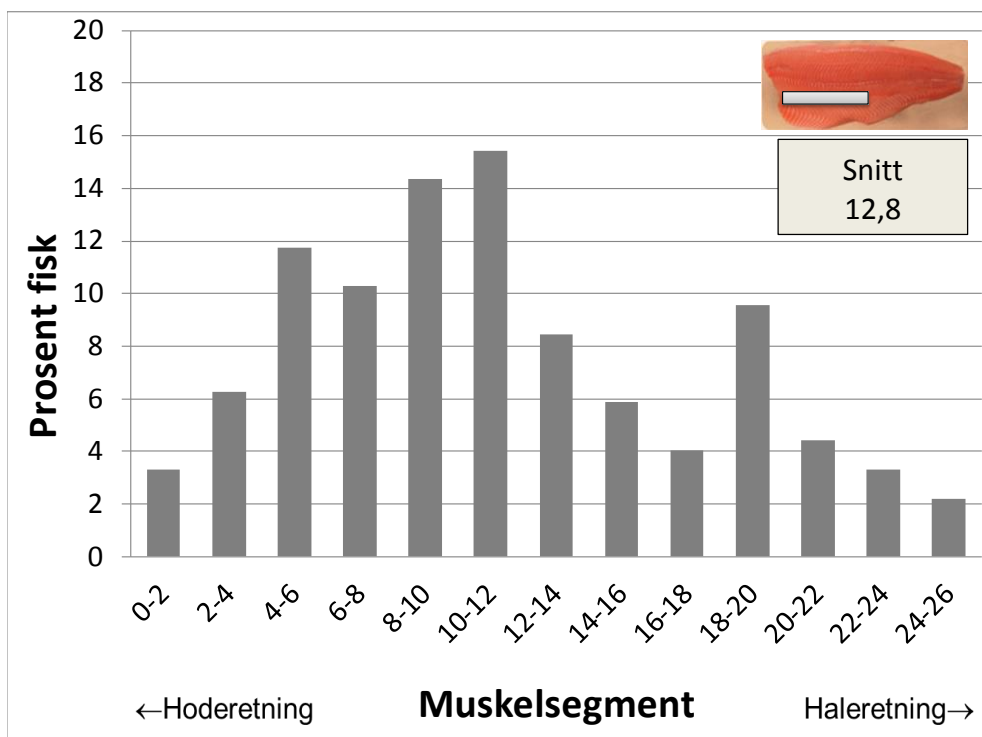
Undersøkelser og registreringer av mørke flekker har tradisjonelt vært gjort i henhold til en skala der plasseringen av flekkene har vært registrert for tre områder: fremre buk (Buk 1), bakre buk (Buk 2) eller rygg (Rygg) (Figur 4). I fôringsforsøkene som ble gjennomført i prosjektet ønsket vi å få nøyaktigere kunnskap om plasseringen og derfor registrerte vi fra hvilket muskelsegment flekken startet, talt fra hodeenden av fileten. Registreringene viste at hoveddelen av flekkene startet ved segment 6–14 for den ene fiskegruppen (ettåringen). Det vil si at dersom fileten hadde en mørk flekk, så var det 70 % sannsynlighet for at flekken satt i dette området. For den andre fiskegruppen var mønsteret ganske likt, bortsett fra en høyere frekvens av flekker i bakre delen av bukområdet, med en topp ved segment 18–12 (nullåring) (Figur 26). Avstanden fra flekken til midtlinjen var også relativt konstant.

Funnet av plasseringen («hot spot») med høyest hyppighet for vevskader har gjort oss i stand til å gå mer spesifikt til verks for å avdekke primærårsaken til at mørkpigmentering oppstår.

A



B

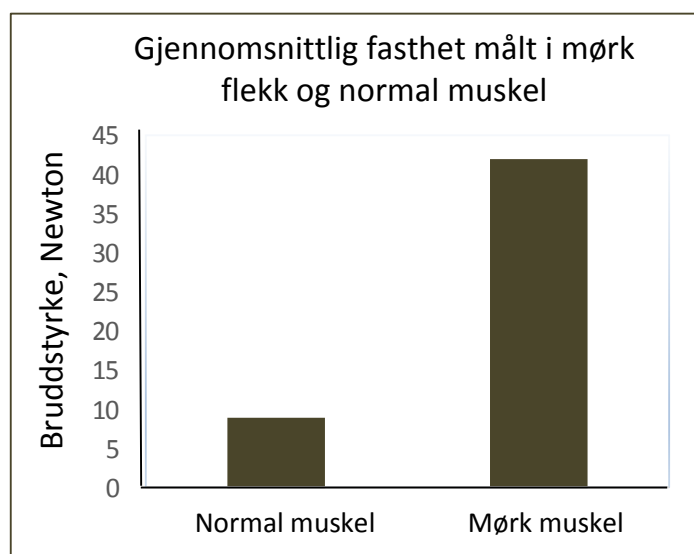


Figur 26 Plassering av flekkene i filet av A) ettåring ($n = 80$ fileter med flekker) og B) nullåring ($n = 210$ fileter med flekker). Resultatene er vist som prosent av fileter med flekker som startet ved muskelsegment 1–26 i fileten, fra hodeenden.

5.3 Tekstur og mineraler

Instrumentelle teksturanalyser viste at mørkpigmentert vev var unormalt hardt (Figur 27) som indikerer akkumulering av arrvev i det mørkpigmenterte vevet. Muskelen ved siden av det mørkpigmenterte vevet hadde normal fasthet og ingen indikasjoner på vevsskader/ arrvevsdannelse.

Følgende mineraler ble målt i mørk muskel og muskel med normalt utseende: kalsium (Ca), magnesium (Mg), selen (Se), natrium (Na), kobber (Cu), fosfor (P), jern (Fe), sink (Zn), kalium (K), aluminium (Al), svovel (S), vanadium (V), krom (Cr), arsen (As), mangan (Mn), nikkel (Ni), strontium (Sr), molybden (Mo), barium (Ba). Ingen mineraler hadde lavere innhold i mørk muskel men for følgende mineraler var innholdet høyere ($p < 0.05$): sink, fosfor, selen, kalium, magnesium og jern. Kun for sink og jern var innholdet unormalt høyt.



Figur 27 Gjennomsnittlig fasthet av misfarget og normal muskel. Den mørkpigmenterte muskelen var unormalt hard, men muskelen utenfor det mørkpigmenterte området av samme fileten var normal. Resultatene er vist som den kraften som skal til for å bryte gjennom overflaten av fileten med en 12,5 mm sylinder (hastighet 1 mm/ sekund, instrument «Texture Analyzer TA-XT2».

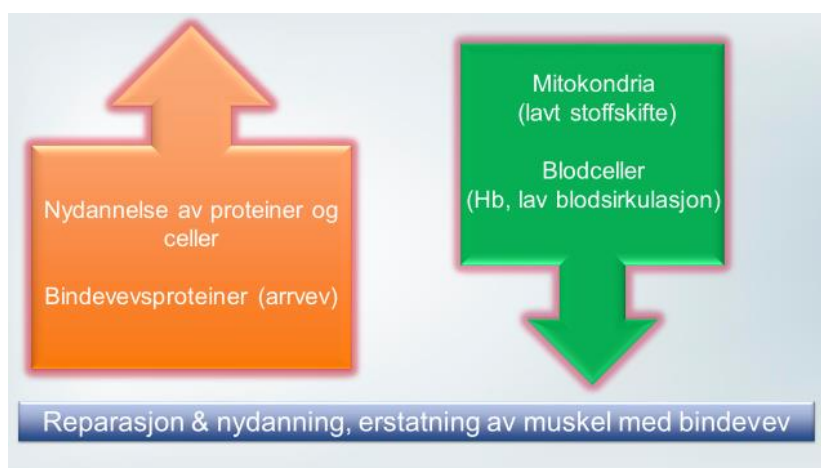
Mørke flekker:
Unormalt hard tekstur og unormalt høyt innhold av sink og jern

5.4 Genanalyser

Resultatene viste betydelige forskjeller mellom vev fra mørke flekker og normalt vev (946 gener høyere uttrykk i mørke flekker og 624 gener lavere uttrykk i mørke flekker – analysert ved microarray). Noe overraskende viste genuttrykksanalysene liten forskjell mellom flekkene selv om de varierte histopatologisk. Største forskjellen var for immungener som var oppregulert i mørke flekker (400 gener), men det er ikke mulig å peke på en enkeltårsak til betennelsen. Mye tyder imidlertid på at mikroorganismer kan være involvert. For vevet som ble undersøkt var det mest sannsynlig bakterier. Det er imidlertid tenkelig at type mikroorganismer i flekkene vil reflektere de som finnes i fisken. Transkriptom-sekvensering av de samme prøvene viste tilstedeværelse av bakterier og uidentifiserte eukaryote organismer i forhøyede nivåer i flekkene sammenlignet med normal muskel fra samme fisk. Det er viktig å avdekke om sykdomsfremkallende organismer er assosiert med flekkene. Vi har ikke funnet sykdomsfremkallende mikroorganismer for mennesker i flekkene.

I likhet med de histologiske observasjonene, viste genanalysene at de mørke flekkene er koblet til en sent utviklende betennelsesprosess. Videre indikerte resultatene nedsatt blodsirkulasjon, dårlig mitokondriefunksjon, aktiv melaninproduksjon, samt aktiv heling med bindevevsproduksjon (arrvev) (Figur 28).

Genanalysene (microarray) pekte på flere aktuelle genmarkører for melanisering, for eksempel *NatTECTIN C*-type lektin.



Figur 28 Grafisk fremstilling av prosesser i mørke flekker avdekket ved microarray analyse.

5.5 Konklusjon og oppfølging

Mørke flekker

- Assosiert med langsomt utviklende betennelse
- Påvist melanin i mørke flekker, men ikke alltid
- Heling pågår i flekkene og de fleste flekker i slaktefisk inneholder arrvev
- Unormalt høyt innhold av sink og jern
- Unormalt hard muskel
- Unormal bindevevsstruktur og sammensetning
- Forhøyet nivå av mikroorganismer

Identifisert «hot spot» i fileten med særlig høy risiko for å utvikle mørke flekker

Forslag til oppfølging

- Utvikle modell for «produksjon» av mørke flekker for å forstå mekanismene og finne mottiltak
- Undersøke om medikamentell behandling (antibiotika/erythromycin) påvirker omfanget i kontrollerte forsøk og derigjennom peke på årsaksfaktorer
- Dybdeundersøkelse av ribbeinsområde av fileten der mesteparten av flekkene utvikles (bukhinne, myocommata, tilstand ribbein – fokus på identifisert «hot spot» område)
- Identifisere genmarkører
- Karakterisere pigmenttyper i flekkene og øke kunnskapen om syntese av pigmenter og pigmentdeponering (melanomakrofager/ melaninceller)
- Mikroorganismer: Sekvensering av vev fra mørke flekker for å identifisere mikroorganismer i mørke flekker (virus, bakterier, sopp, parasitter) fra lokaliteter med geografisk gradient. Dyrke vev fra mørke flekker og undersøke og identifisere vekst av mikroorganismer.

6 Resultater – instrumentell deteksjon av mørke flekker i sløyd fisk

Forfattere: Karsten Heia, Jens Petter Wold

Deteksjon av mørke flekker i filet ved måling av hel fisk vil gi mulighet til å frasortere laks med flekker til krevende kunder som stiller strenge krav til utseendet, f.eks. røykeindustrien. Videre kan slik måleteknologi som kan skille på blod og melanin være et viktig forskningsverktøy som gir mulighet til å følge utviklingen av mørke flekker over tid i enkeltfisk.

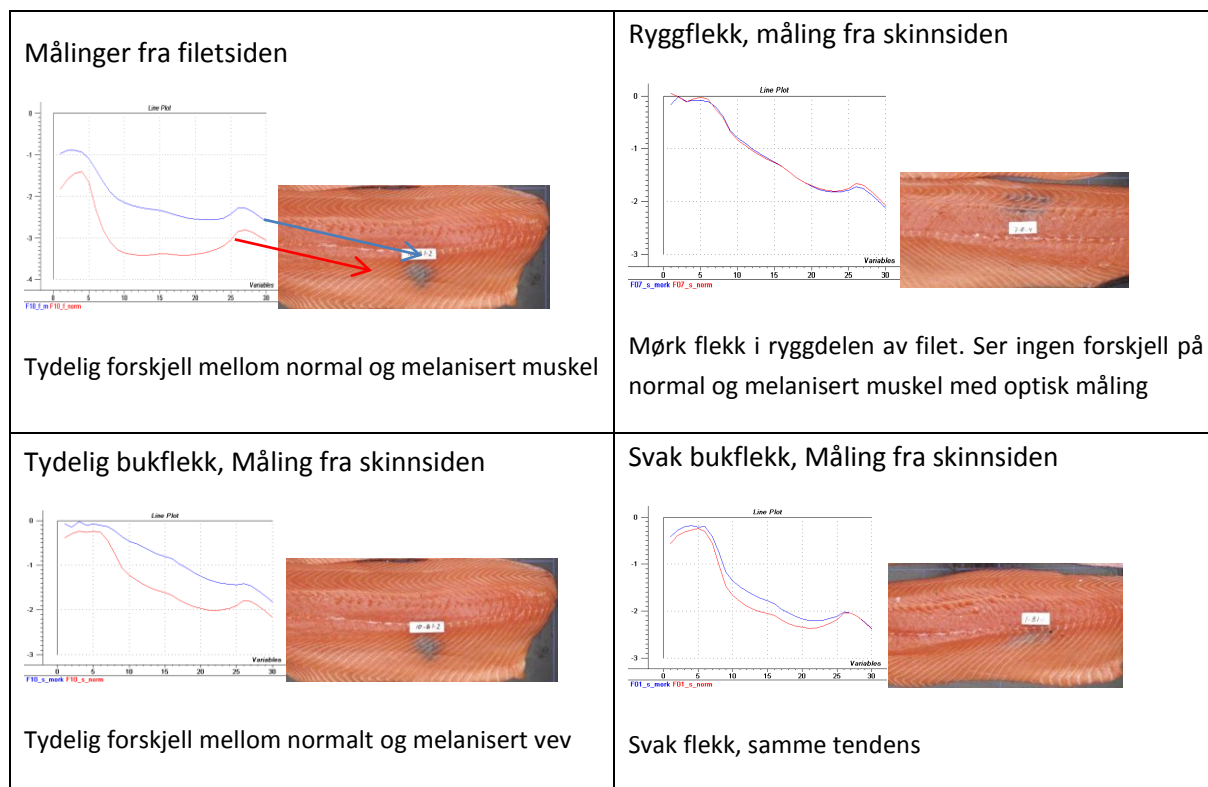
Vi har tidligere vist at det er mulig å detektere mørke flekker på filetlinja ved bruk av spektropiske metoder. I dette prosjektet ønsket vi å undersøke om det er mulig å detektere mørke flekker i filet ved å måle sløyd fisk fra skinnsiden. Lakseskinn har en del melanin som kan sees som svarte prikker, spesielt i ryggen. Dette melaninet gir måleteknisk utfordringer siden melaninet absorberer mye av lyset under målingene. Lakseskinnet i buken har ikke, eller få slike melaninprikker. Siden mesteparten av de mørke filetflekkene sitter i bukområdet av filet, valgte vi å fokus på dette området.

To ulike hurtigmetoder ble testet for å undersøke muligheten for å detektere mørke flekker i filet. Målingene ble utført ved bruk av spektroskopiske instrumenter, både fra filetsiden og skinnsiden. Filetene som ble benyttet hadde flekker med ulik grad av mørkpigmentering slik som beskrevet i Tabell 5.

6.1 NIR

NIR (nær infrarød) og VIS (visuell) spektroskopi er teknikker der lys sendes gjennom en matvare for å måle hvor mye lys som absorberes på ulike bølgelengder. Dette er raske målemetoder som egner seg til å måle ulike egenskaper i mat, slik som sammensetning av næringsstoffer og pigmenter. NIR er den mest utbredte on- og at-lineteknikken i fôr- og matindustri.

Målingene viste høyere absorpsjon i vev med melanin (blå spekter), og at det er mulig å detektere mørke filetflekker gjennom lyst skinn. Det vil si at det bør være mulig å detektere mørke flekker i bukområdet ved scanning av buksiden av hel fisk. Ryggen er mer problematisk ettersom den er kraftig pigmentert.

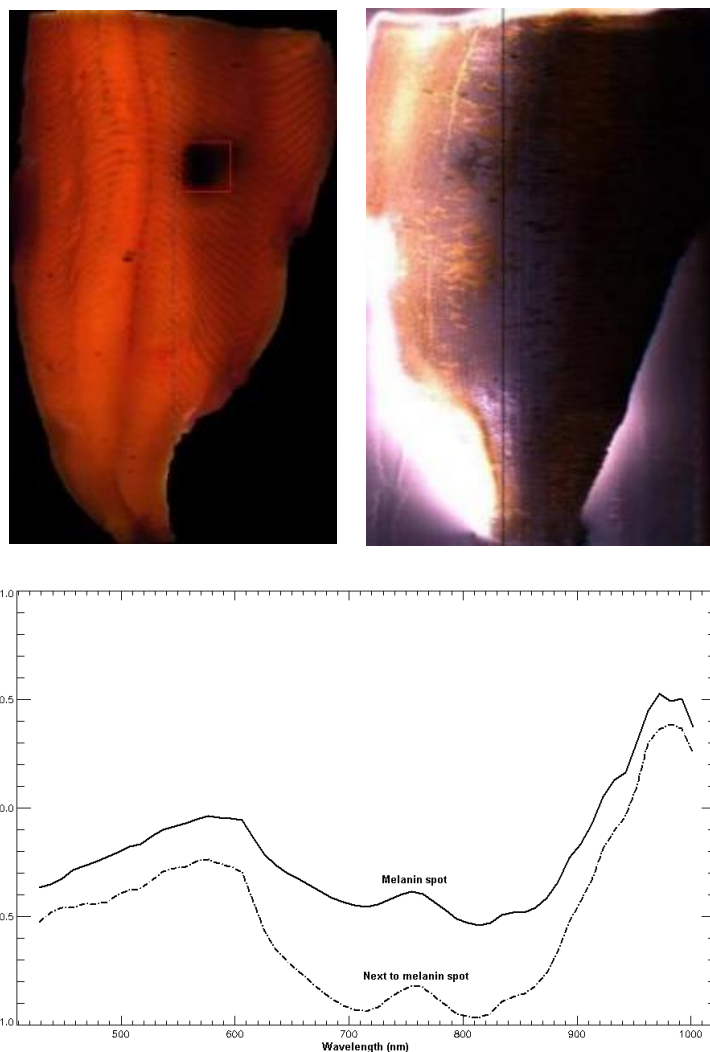


Figur 29 Mørke flekker målt ved bruk av NIR.

6.2 Avbildende spektroskopi

Avbildende spektroskopi er en annen metode hvor det lages bilder av en matvare der hvert punkt (piksel) i bildet presenteres som et lysspekter. Ut fra dette kan man lage et todimensjonalt kart som gir informasjon om produkttegenskaper. Avbildende spektroskopi kan brukes til å måle kjemiske og fysiske komponenter.

Målingene viste at det er mulig å detektere melanin/blod flekker gjennom skinnet i bukområdet ved bruk av avbildende interaktansspektroskopi, slik det fremgår av Figur 30.



Figur 30 Måling av mørke flekker gjennom skinnet ved bruk av avbildende spektroskopi

6.3 Konklusjon og oppfølging

Det er mulig å påvise mørke flekker i filet gjennom skinnet på sløyd laks. Objektive hurtigmetoder har således et stort potensial for sortering av laks med hensyn til mørkpigmentering av filet. Påvisning av mørke pigmenter i ryggpartiet i fileten er derimot vanskelig siden laksen har mye melaninpigmenter i skinnet som forstyrrer målingene.

Optimalisering av metodikkene som er testet i prosjektet vil med stor sannsynlighet lede til utvikling av on-line verktøy som kan sortere ut fisk med mørke flekker i bukpartiet. Optimalisering av teknologien kan dessuten gi oss et forskningsverktøy som kan gi nyttig kunnskap om utviklingsforløpet av mørke flekker.

7 Resultater - effekt av vaksine

Forfattere: Turid Mørkøre, Kjellrun H. Gannestad

To fiskepopulasjoner ble undersøkt gjennom hele produksjonen, ettåring og nullåring. Resultatene var tilsvarende for fiskegruppene og presentert derfor samlet.

7.1 Melanisering

Melanisering av bukhinnen ble observert allerede før vaksinerings i ferskvannsfasen, men på det tidspunktet var organene ikke melaniserte. Etter vaksinerings observerte vi melanisering av organene, men melaninflekker i filet ble ikke observert før i sjø, 4 måneder etter utsett da laksen veide cirka 0,5 kg. På det tidspunktet var flekkene veldig små og svakt pigmenterte og 6 % av filetene hadde flekker. Da laksen veide 1 kg hadde forekomsten økt til 10 %, men flekkene var fortsatt små og svakt pigmenterte (Figur 32).

Melaniseringen av organer var konsekvent høyere for vaksinert laks sammenlignet med uvaksinert laks og differansen mellom fiskegruppene var relativt konstant (Figur 35). Melanisering av bukhinnen var også konsekvent høyere for vaksinert laks, men forskjellen mellom fiskegruppene var ikke så markant som for organer. Ved slakt hadde den vaksinerte laksen høyere melanisering av organer og bukkinne sammenlignet med uvaksinert laks (noe større forskjell for nullåringen), men var ingen effekt av vaksine på mørke flekker i filet for ettåringen eller nullåringen.



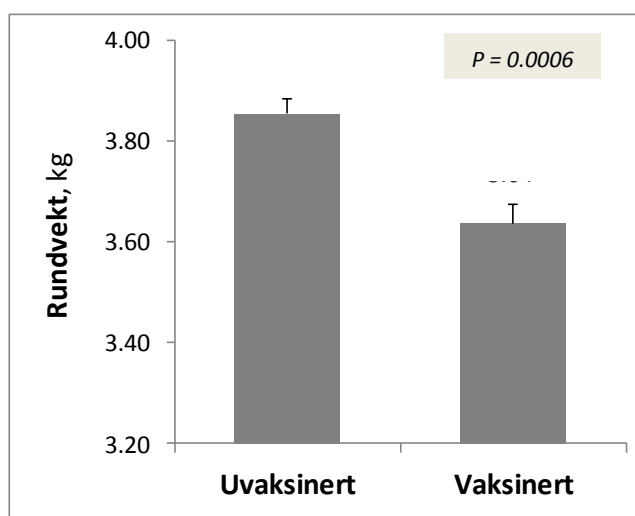
Figur 31 *Undersøkelser av ettåringen i ferskvann 4/4-2013. Kvalitet av vaksinerings, melanin i bukkinne, organer og filet, prøvetaking av vev til mikroskopering. Bildet nederst til høyre viser tankene som laksen gikk i ferskvann.*



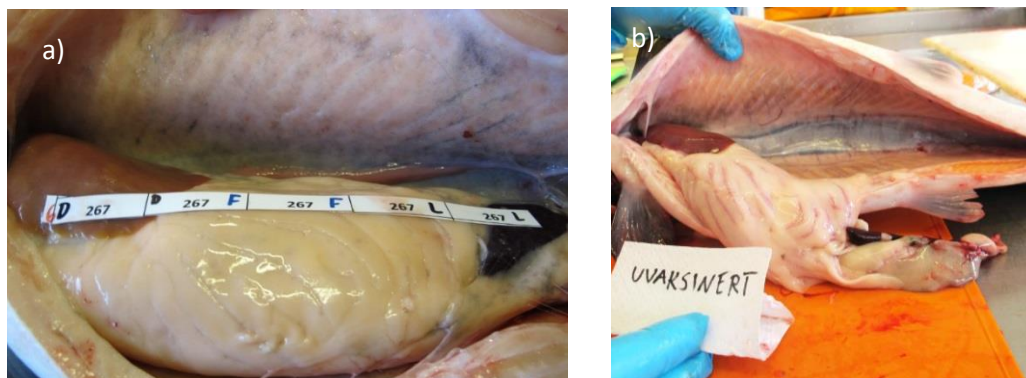
Figur 32 Flekkene i én-kilos laks var små og svakt pigmenterte.

7.2 Tilvekst

Den uvaksinerte laksen var 6-7 % tyngre ved slakt (Figur 33) og forskjellen var statistisk signifikant for både ettåringen og nullåringen.



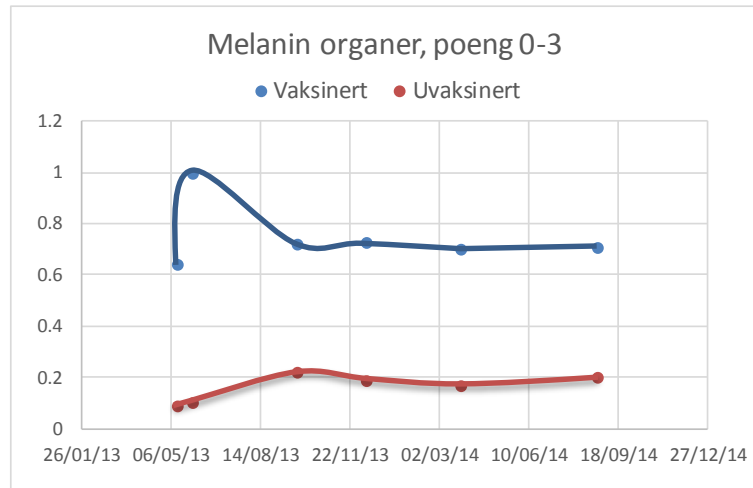
Figur 33 Slaktevekten for uvaksinert og vaksinert laks (ettåring), august 2014.



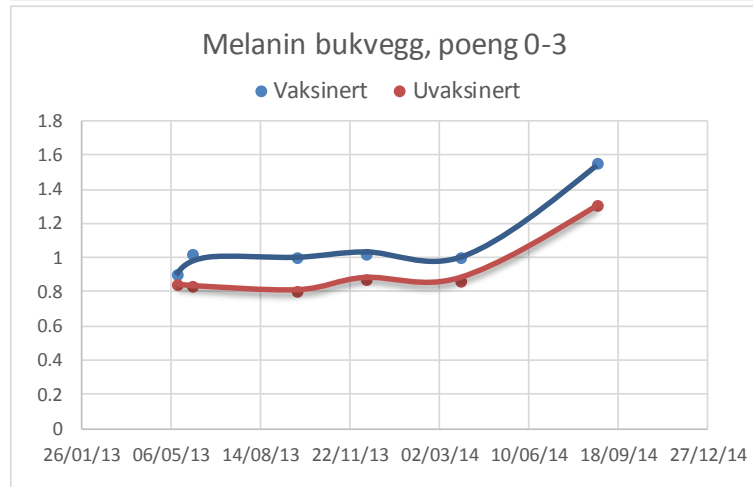
Figur 34 Melanisering av bukvegg observert i både vaksinert (a) og uvaksinert laks (b).

Melanin i laks fra smolt til slaktestørrelse

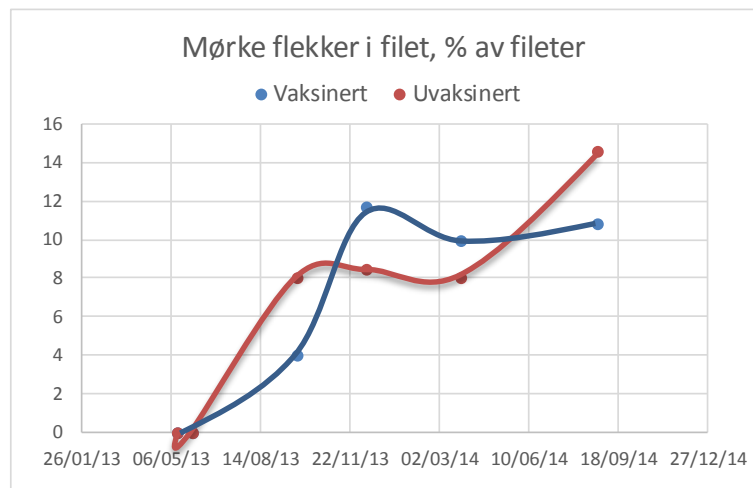
A)



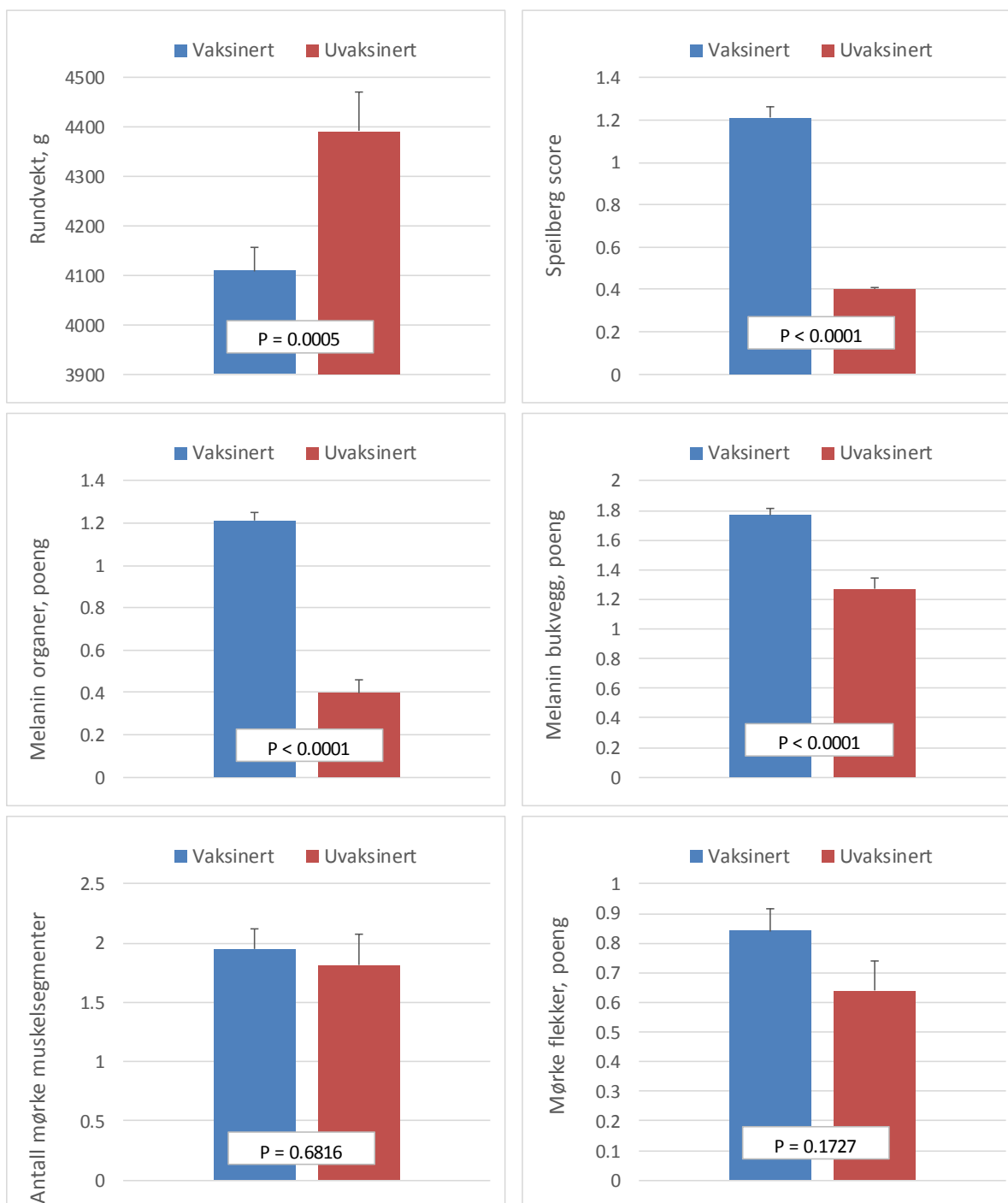
B)



C)



Figur 35 Vaksinert og uvaksinert 1+laks ble vurdert fra smoltstørrelse til slakt for (A) melanisering av organer, (B), melanisering av bukhinne og (C) og frekvensen av mørke flekker i filet gjennom forsøksperioden fra mai 2013 til august 2014.



Figur 36 Egenskaper for vaksinert og uvaksinert 0+ laks: Rundvekt, sammenvoksinger av organer (Spielberg score, 0–6 poeng), melanin i organer (0–3 poeng), bukvegg (0–3 poeng), antall mørke muskelsegmenter i filet og melanin score vurdert i henhold til FHF standarden. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm standardfeil (SE). P verdier lavere enn 0.05 indikerer at forskjellen mellom fiskegruppene er statistisk signifikant.

7.3 Konklusjon og oppfølging

- Ingen forskjell i forekomsten av mørke flekker i filet mellom vaksinert og uvaksinert laks
- Melanisering av bukhinne høyere i vaksinert enn uvaksinert laks
- Melanisering av organer høyere i vaksinert enn uvaksinert laks
- Melanisering av organer, bukhinne og filet synes å være ulike egenskaper
- Uvaksinert laks var 6-7 % tyngre ved slaktetidspunkt sammenlignet med uvaksinert laks

Forslag til oppfølging

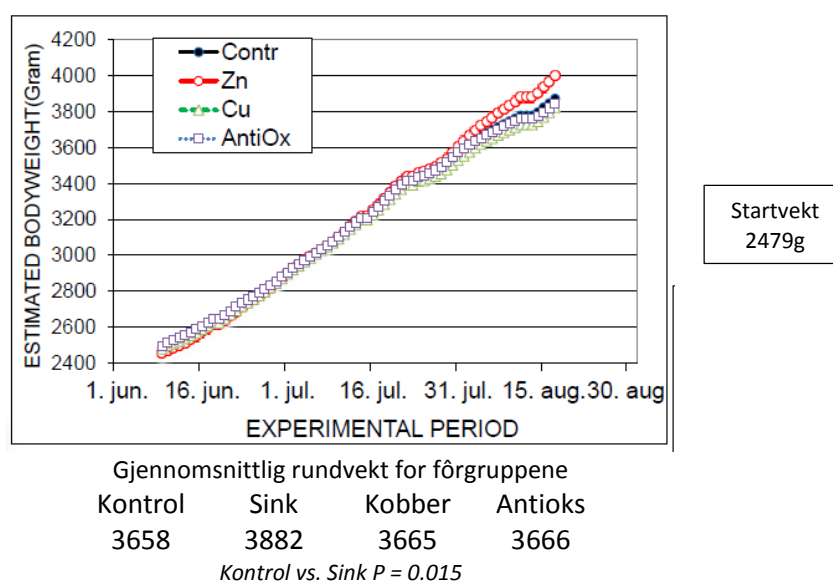
- Arbeidet med å redusere forekomsten av mørke flekker i filet bør ikke ha fokus på vaksine nå
- Det bør arbeides videre med å utvikle vaksiner som ikke hemmer tilveksten

8 Resultater – effekt av fôr

Forfattere: Turid Mørkøre, Yuqiong Meng, Thomas Larsson, Jens-Erik Dessen, Magnus Åsli, Kjellrun H. Gannestad, Grete Bæverfjord, Odd Helge Romarheim, Kjell-Arne Rørvik

8.1 Tilvekst

Tilsetning av sink i fôret til ettåringen ga økt tilvekst (224 g tyngre som tilsvarer 6 %; Figur 37). De andre fôrtilsetningene som ble undersøkt ga ingen effekt på tilveksten. Det var ingen effekt av fôr på tilvekst for nullåringen (4,2 kg i gjennomsnitt).

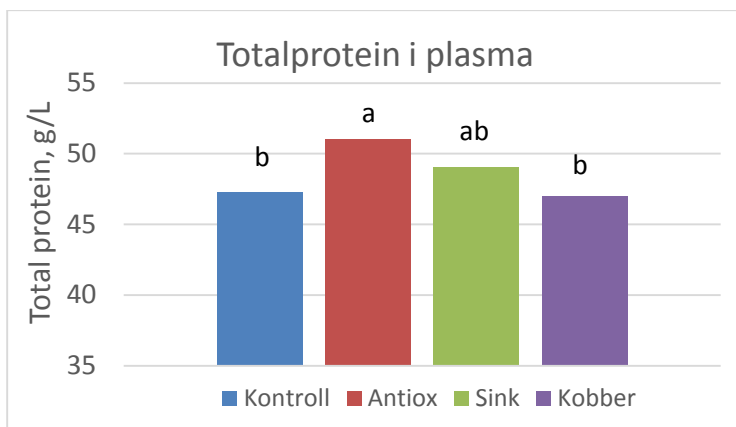


Figur 37 Utvikling i rundvekt for 1+ laksen i perioden juni – august og slaktevekten ved forsøkets avslutning. Fôrene i forsøket var Kontrollfôr (Contr), det samme fôret tilsatt antioksidanter (vitamin E og selen) (Antiox), sink (Zn) eller kobber (Cu). Laksen som fikk sink gjennom hele forsøksperioden var også større enn laksen som fikk kontrollfôr.

8.2 Plasmaanalyser

Blodprøver ble tatt av laks fra de ulike fôrbehandlingene. Laksen ble tatt opp fra merdene med våthov og bedøvd (MS222) eller den ble trengt i to minutter i tørrhov før blodprøvetaking. Plasmaprøvene ble analysert for elektrolytter, metabolitter og enzymer. Analysene ble utført av Sentrallaboratoriet, Oslo.

Nivå av protein (spesielt globulin) i plasma var signifikant forskjellig mellom fôrbehandlingene, med høyere nivå i laksen som fikk ekstra antioksidanter i fôret sammenlignet med kontrollfôr (Figur 38). Effekt av trenging er beskrevet i avsnitt 12.4 (Figur 60).



Figur 38 Totalprotein i plasma. Resultatene er vist for laks slaktet i henhold til standard prosedyre. Laksen hadde fått ulike fôr i perioden juni – august: Kontrollfôr (standard kommersielt fôr) eller det samme fôret tilsatt antioksidanter (vitamin E og selen), sink eller kobber. Fôrbehandlinger med ulike bokstaver over søylene er signifikant forskjellige ($P < 0.05$). Bildet til høyre viser hvor blodprøvene ble tatt.

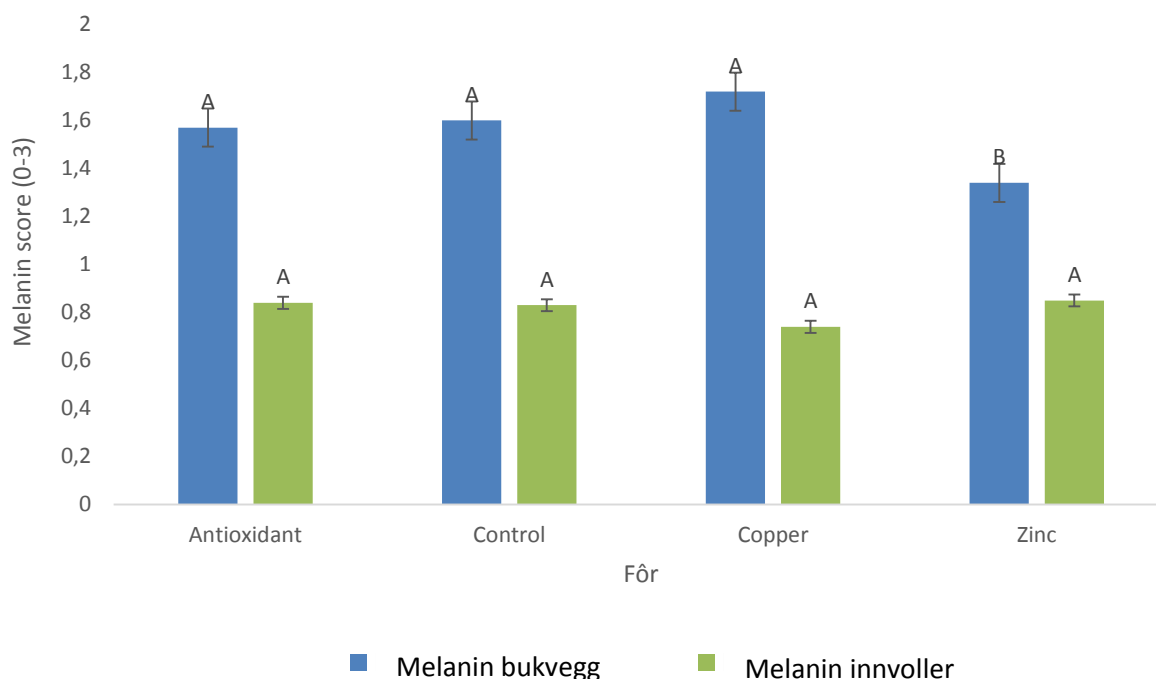
8.3 Melanisering

Melaniseringen av innvoller var mest konsentrert i området under ryggen, opp mot svømmeblæren. Kraftig melanisering i området rundt spiserøret ble også observert. Dette mønsteret var generelt for fiskegruppene i forsøket (Figur 39)

Melanisering av innvoller viste ingen forskjell mellom fôrbehandlingene for ettåringen (Figur 40), men laksen som hadde fått ekstra tilsetning av sink i fôret hadde signifikant lavere grad av melanisering av bukhinnen. For nullåringen var melanisering av organer bukhinne høyere for kontrollgruppen. Det vil si at tilsetning av antioksidanter i fôret hadde en reduserende effekt på melanisering av samtlige vev som ble undersøkt.



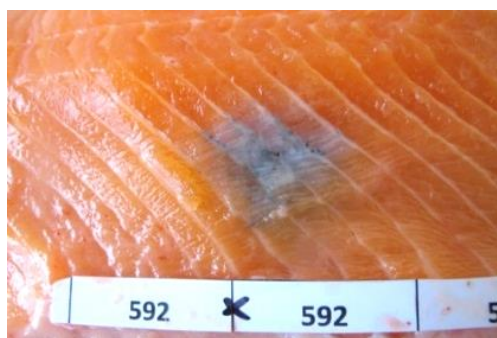
Figur 39 Melanisering av innvoller.



Figur 40 Grad av melanisering av bukvegg og innvoller (0–3 poeng) i ettåring.

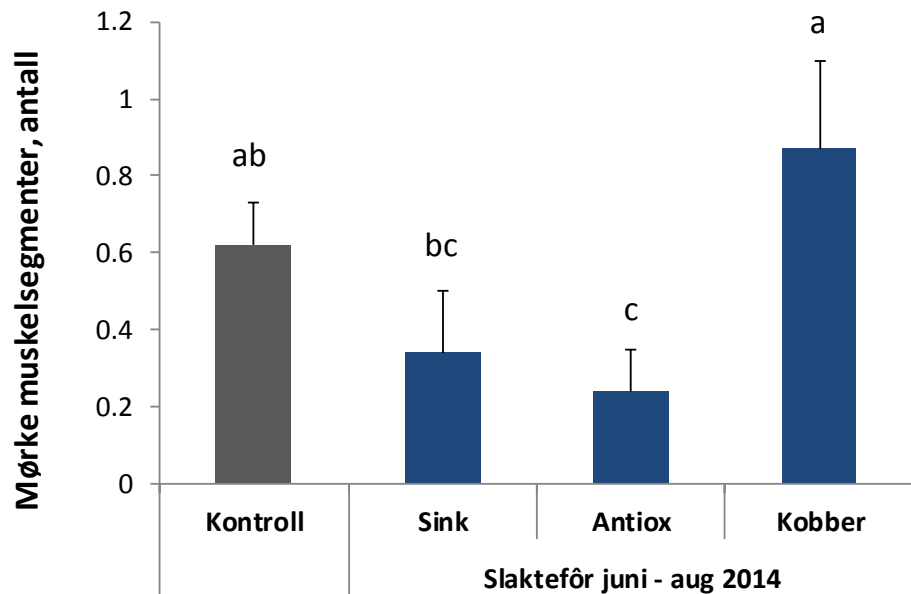
Melanin i filet ble analysert med hensyn til utseende, plassering av flekkene og størrelse.

Visuell bedømmelse av flekkene ble gjort i henhold til farge: rød («blod»), svart/brun («melanin») og hvit/grå («arr») (Figur 41). Registreringene viste at de fleste flekkene var brunsvarte med og uten innslag av arrvev. Kun en liten andel flekker hadde flekker med blod og ingen flekker hadde en kombinasjon av blod og brunsvart pigmentering.



Figur 41 Typisk flekk i laks fra forsøket

For ettåringen hadde 16 % av laksen mørke flekker i filet i gjennomsnitt. Innblanding av ekstra antioksidanter i fôret i perioden før slakt hadde en hemmende effekt på utviklingen av mørkpigmenterte flekker i filet (Figur 42). Den samme tendensen ble observert for sink, men effekten var ikke så tydelig (ikke statistisk signifikant). Ekstra tilsetning av kobber i fôret førte til økt mørkpigmentering. Resultatene viser for første gang, at førsammensetningen påvirker utviklingen av mørke flekker i filet.



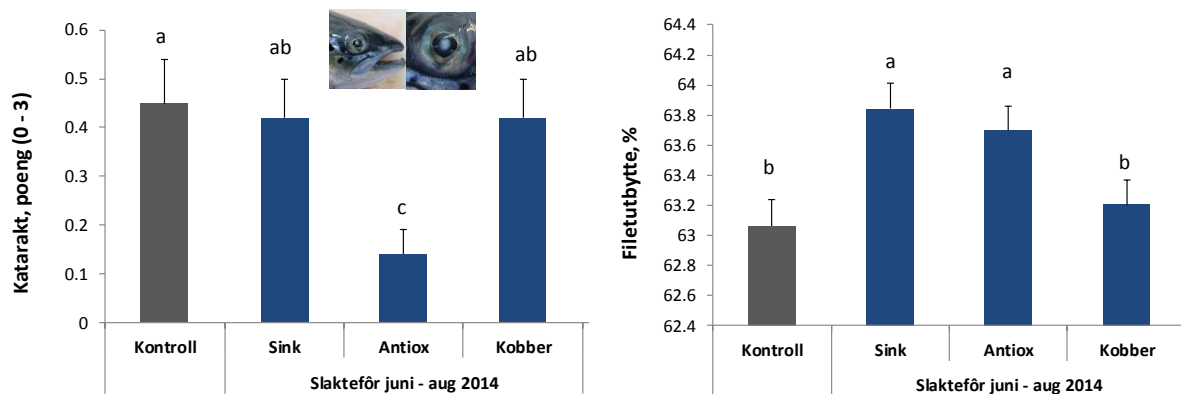
Figur 42 Mørke muskelsegmenter i filet av 1+ laks vurdert etter slaktefôring juni - august. Laksen fikk fire ulike fôrtyper: Kontrollfôr (standard kommersielt fôr) eller det samme fôret tilsatt sink (Sink), vitamin E og selen (Antiox) eller kobber (Kobber). Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik og bokstavene over søylene indikerer signifikans ($P < 0.05$).

Forekomsten av mørkpigmentert muskel var dobbelt så høy for nullåringen (32 %) som for ettåringen (16 %). For nullåringen var effekten av å tilsette antioksidanter i fôret enda mer tydelig enn for ettåringen. For fileten, var frekvensen redusert med 13 % enheter, fra 39 % i kontrollgruppen til 26 % for antioksidant gruppen. I dette forsøket ble all form for mørkpigmentering registrert, derfor kan frekvensen være noe høyere enn forventet ved registrering ved filetlinjen. Den markante reduksjonen er uansett interessant og resultatene tyder på at det er mulig å oppnå en vesentlig reduksjon ved tilsetning av antioksidanter i fôret. Vi kan ikke peke på hvilken av antioksidantene gav de positive resultatene. Det er også mulig at optimal fôringsperiode bør justeres. Behovet for antioksidanter i fôret er en annen vesentlig faktor som kan ha betydning. Årstid, oppdrettsbetingelser og helsesituasjon til fisken er faktorer som kan påvirke behovet for antioksidanter.

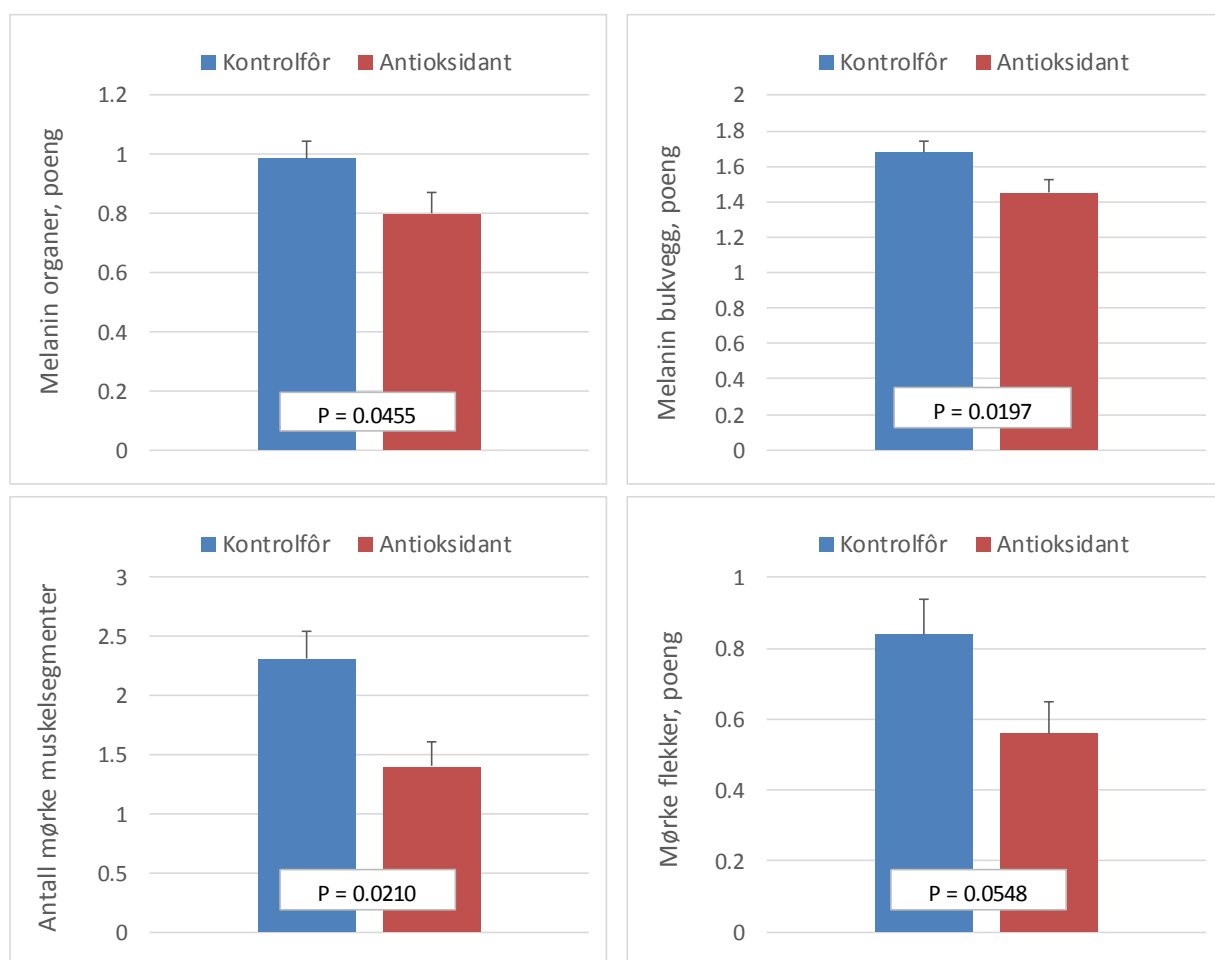
8.4 Filetutbytte, katarakt

I tillegg til mørke flekker, hadde fôrbehandlingene også effekt på grå stær (katarakt) og filetutbytte. Graden av katarakt var lav, men det er interessant at laksen som fikk ekstra antioksidanter i fôret hadde signifikant lavere grad av blakking av linsa. Fôring med ekstra tilsetning av sink gav også lavere score for katarakt sammenlignet med kontrollfôret. Fôring med ekstra tilsetning av antioksidanter eller ekstra tilsetning av sink hadde samme positive effekt på filetutbytte (0,8 % økning sammenlignet med kontrollfôret). Dette var en overraskende effekt som var signifikant for ettåringen, men ikke for nullåringen, selv om tendensen var den samme for både katarakt og filetutbytte (Tabell 8). Proteininnholdet i filet var signifikant høyere i filet hos ettåringen som fikk antioksidanter i fôret.

Samlet sett viser resultatene at det er positivt å tilsette antioksidanter i fôret. Det bør imidlertid nevnes at leveren til laksen som fikk ekstra antioksidanter i fôret var vesentlig lysere sammenlignet med de andre fôrgruppene. Dette er en faktor som bør undersøkes nærmere.



Figur 43 Katarakt (venstre) og filetutbytte (høyre) for 1+ laks som fikk ulike fôr i perioden før slakt. Katarakt ble vurdert fra 0-3 for hvert øye. Filetutbytte er beregnet som prosent filet i forhold til kroppsvekt.



Figur 44 Egenskaper for 0+ laks som var fôret med et standard fôr (kontrollfôr) eller det samme fôret tilsatt vitamin E, vitamin C og selen i perioden januar – mars 2015: Rundvekt, sammenvoksinger av organer (speilberg score, 0–6 poeng), melanin i organer (0–3 poeng), bukvegg (0–3 poeng), antall mørke muskelsegmenter i filet og melanin score vurdert i henhold til FHF standarden. Resultatene er vist som gjennomsnitt ± standardfeil (SE).

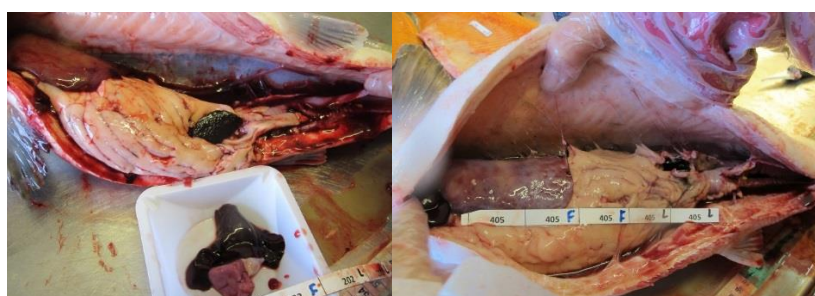
Tabell 8 Katarakt, filetutbytte, farge på lever og filet av nullåring samt filetspalting av laks som fikk enten et standardfôr (kontrollfôr) eller det samme fôret tilsatt antioksidanter i to måneder før slakt, mars 2013.

	Fôr		P- verdi
	Kontroll	Antioksidant	
Katarakt, poeng	1,17 ± 0,14	0,91 ± 0,15	0.2405
Filetutbytte, %	62,9 ± 0,1	63,7 ± 0,1	0.1423
Leverfarge, poeng	3,2 ± 0,06	2,8 ± 0,10	0.0016
Filetfarge, poeng	25,5 ± 0,1	25,5 ± 0,2	0,9251
Filetspalting, poeng	0,92 ± 0,1	0,81 ± 0,1	0,4637

Resultatene er gitt som gjennomsnitt (LSMeans) med standardfeil. Leverfargen ble bedømt etter en skala fra 1–5, der 1 er veldig lys og 5 er veldig mørk



Figur 45 Fileter av nullåringen som ble slaktet mars 2015. Bildet illustrerer ulike typer flekker som ble observert.



Figur 46 Nullåring slaktet mars 2015. Hos enkelte fisk ble det observert blodkoagel i hjertehulen, avvikende utseende av lever, svullen milt samt væske i bukhusen. Dette er generelle sykdomstegn ved HSMB. Det var ikke registrert dødelighet på lokaliteten og fisken var ikke diagnostisert med HSMB. Laksen med blodkoagel i hjertehulen hadde ikke forhøyet melaninscore i filet.

8.5 Mykotoksinet DON

Tilsetning av mykotoksinet deoksynivalenol (DON) i fôret hadde ingen effekt på fôrinntaket eller tilveksten. Det var heller ingen effekt på mørkpigmentering av organer, bukhinne eller filet. Innblanding av DON førte imidlertid til en signifikant økning av speilberg score, og leveren endret utseende til en mørkere farge (Tabell 9, Figur 47). For enkelte fisk var leveren nærmest kirsebærfarget, men for de fleste laksene var leverfargen innenfor normalområdet. Fargen på filet var blekere for laksen som fikk DON fôret.

Resultater fra fôringsstudien samt injisering av DON viste ingen akutt deponering av melanin i filet, men negative langtidseffekter kan ikke utelukkes. Spesielt tatt i betraktning at filetene ble blekere, hvilket kan indikere forbruk av pigmenter knyttet til oksidativt stress.

Tabell 9 Rundvekt, katarakt, speilberg score, leverfarge og melanin i ulike vev av laks som fikk et standardfôr (Kontrollfôr) eller det samme fôret tilsatt mykotoksinet deoksynivalenol (DON).

	Kontrollfôr	DON
Rundvekt, g	4,18	4,27
Katarakt, poeng	1,2	1,6
Speilberg score	0,4 ^b	1,1 ^a
Leverfarge, poeng	3,2 ^b	3,7 ^a
Melanin organer, poeng	1,0	1,1
Melanin bukhinne, poeng	1,7	1,7
Melanin i filet, score	0,9	0,8
Mørke segmenter, antall	2,3	1,9
Filetfarge, SalmoFan score	25,5 ^a	24,9 ^b



Figur 47 Laks som hadde fått fôr med mykotoksinet DON.

8.6 Konklusjon og oppfølging

Resultatene viste klare føreffeater på melanisering. I tillegg fant vi også effekter på tilvekst, helseparametere, utbytte og andre kvalitetsegenskaper av laksefilet.

Tilsetning av antioksidanter i fôret

- Redusert forekomst av mørke flekker i filet
- Redusert melanisering av bukhinne og organer
- Økt filetutbytte
- Mer protein i filet og plasma
- Mindre katarakt
- Blekere leverfarge

Tilsetning av sink i fôret

- Ingen effekt på mørke flekker i filet
- Mindre melanin i bukhinne
- Økt tilvekst og økt filetutbytte

Tilsetning av kobber i fôret

- Økt forekomst av mørke flekker i filet

Tilsetning av mykotoksiner (DON)

- Ingen effekt på mørke flekker i filet
- Økt grad av sammenvoksninger i bukhole
- Mørkere leverfarge og blekere filetfarge

Forslag til oppfølging

Resultatene fra forsøkene viser for første gang at visse fôrkomponenter kan redusere forekomsten av mørke flekker i laksefilet. Dette er lovende resultater men det er likevel en del vesentlige spørsmål å besvare.

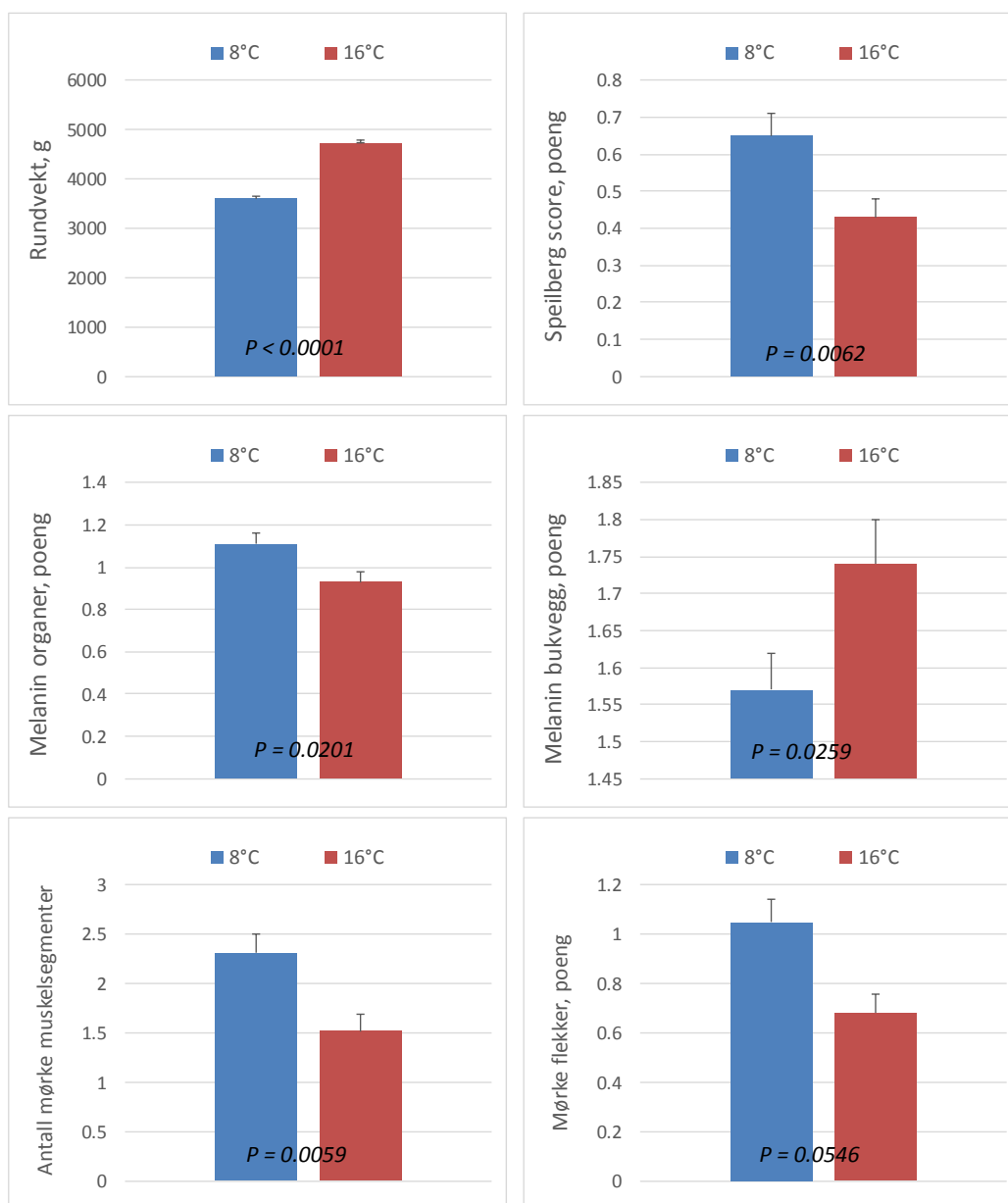
- Vil bruk av antioksidanter tidligere i livsfasen være gunstig.
- Optimaliser type antioksidant(er) og nivå
- Kartlegge årsaken til at antioksidantene fungerer. Nyttig å vite om de positive effektene skyldes underdekning av antioksidanter i fôret til dagens oppdrettslaks, eventuelt i hvilken grad tilsetningen av antioksidanter i fôret kan hemme melaninsyntesen. Om det er mulig å hemme melaninsyntesen er det andre komponenter som kan være aktuelle hemmere.
- Vi kan ikke utelukke at de positive effektene vi har sett ved bruk av antioksidanter kan være koblet til redusert akkumulering av pigmentet lipofuscin. Bedre kunnskap om pigment-sammensetningen av mørke flekker vil kunne gi nyttig kunnskap.

Det er svært interessant å undersøke biokjemien nærmere for å forstå melaninsyntesen/deponering av mørke pigmenter i laksemuskel. Økt forståelse vil gjøre oss bedre i stand til å sette inn målrettede tiltak for å redusere forekomsten.

9 Resultater – effekt av temperatur i ferskvannsfasen

Forfattere: Turid Mørkøre, Kjell-Arne Rørvik, Jens-Erik Dessen, Kjellrun Gannestad

Laksen som ble holdt ved 8 °C i ferskvann veide 70 g ved overføring til sjøvann i september 2013 mens laksen som ble holdt ved 16 °C i ferskvann veide 100 g ved overføring til sjøvann. Ved slakt i mars 2015, var vektforskjellen på 1 kg (Figur 48).



Figur 48 Egenskaper for 0+laks holdt ved enten 8 °C eller 16 °C før den ble overført i sjøvann: Rundvekt, sammenvoksinger av organer (speilberg score, 0–6 poeng), melanin i organer (0–3 poeng), bukvegg (0–3 poeng), antall mørke muskelsegmenter i filet og melanin score vurdert i henhold til FHF standarden. Resultatene er vit som gjennomsnitt ± standardfeil (SE) ($n = 630$)

Tabell 10 Resultater fra registreringer av nullåringen før vaksinerings (25 fisk fra hvert temperaturregime)

	9 grader	16 grader	P-verdi
Sammenvoksinger, score (0-6)	1.04	1.20	0.1967
Melanin bukvegg, score 0-3	2.0	2.0	0.3223
Melanin innvoller	0	0	-
Melanin filet	0	0	-
CSI, %	0.12	0.11	0.2737
HSI, %	1.47	1.42	0.4131

Registreringer av nullåringen før vaksinerings viste at bukveggen var mørkpigmentert, men det ble ikke observert melanisering av innvoller eller filet (Tabell 10).

9.1 Melanisering

Forekomsten av mørke flekker i filet var over 30% lavere for laksen som ble holdt ved 16°C i ferskvann. Ved slakt var graden av organsammenvoksinger lav, men høyere for laksen holdt ved 8 °C i ferskvann. Melanisering av organer og filet var også høyere for laksen holdt ved 8 °C sammenlignet med den holdt ved 16 °C, men for melanin i bukvegg hadde laksen holdt ved 16 °C høyest score (Tabell 10).

9.2 Konklusjon og oppfølging

Laksen som ble holdt ved 16°C i ferskvann hadde 30% mindre mørkpigmentering av filet sammenlignet med laks holdt ved 8°C. Laksen ved 16°C var større ved vaksinerings og også større ved utsett. Fisken gikk blandet i de samme nøtene hele sjøfasen. Det er interessant å undersøke om den kraftige reduksjonen av mørke flekker er knyttet til smoltstørrelse ved utsett eller om størrelse ved vaksinerings kan påvirke melanisering av filet ved slakt. I vår studie undersøkte vi nullåring. Det er også interessant å undersøke om det er mulig å oppnå samme positive effekt for ettåring.

10 Patologi

Forfattere: Agnar Kvellestad, Elin Christine Valen og Erling Olaf Koppang

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap (Veterinærhøgskolen), Institutt for basalfag og akvamedisin (BasAm) har gjennomført studiene av patologi.

Vi har samlet inn materiale fra Averøy ved utvalgte uttak og undersøkt de patologiske forandringene i muskulatur og enkelte organer. Videre er det gjennomført serumanalyser fra fisk samt genekspresjonsstudier. Serumanalysene har hatt som formål å identifisere eventuelle sammenhenger mellom melaninflekker og ulike parametere i blodet. Ekspresjonsanalysene har hatt som formål å karakterisere affisert vev bedre med henblikk på patogenesen bak forandringene. I tillegg til materiale innsamlet på Averøy har vi assistert prosjektet med histologiske undersøkelser av annet mottatt materiale. Dette er ikke tatt med i denne rapporten. På grunn av langvarig sykemelding hos forskeren som var ansatt i 20 % stilling på prosjektet i 2015 er vi på etterskudd med arbeidet i forhold til det planlagte.

10.1 Materiale og metoder

Ett utsett med ett-åringer (sjøsatt våren 2013) og ett med null-åringer (sjøsatt høsten 2013), har blitt fulgt gjennom sekvensielle prøveuttak fra før vaksinerings i ferskvannsfasen på Sunndalsøra og gjennom sjøvannsfasen på Averøy/Ekkilsøy frem mot slakting (Tabell 11).

All prøvetaking foregikk i forskningsfasilitetene på Sunndalsøra og Ekkilsøy, med ett unntak hvor 0-åringer ble sendt på is fra Sunndalsøra til Ås for prøvetaking.

Prøvetakingsprotokollen har variert mellom grupper av fisk, og har i hovedsak vært enten et mer omfattende (stort) uttak og et mindre (redusert) uttak.

Fisken ble avlivet med en overdose av bedøvelsesmiddel, det ble tatt blodprøve fra kaudalkarene, halen ble kappet for avblødning. Fisken ble inispisert utvendig, og venstre gjellelokk og samsidige bukvegg ble deretter fjernet slik at bukhinne med mer kunne vurderes. Til slutt ble det lagd mange snitt i muskulaturen på hver side. Ved obduksjonen ble det tatt ulike typer av prøver fra ulike organer. Avblødningstiden ble benyttet til å ta prøvene fra hode- og svelgregionen, noe som også kortet ned tiden.

Alle melaninflekker i muskulatur ble registrert, uansett hvor de var, og det ble tatt prøver fra de fleste. Flekker inkluderer ikke melanin langs ribben og større kar, og heller ikke lokal melanisering som resultat av at bukhinnebetennelse har spredt seg videre i bukveggen.

Makroskopiske og histologiske forandringer er semikvantifiserte ved hjelp av skalaen *ikke påvist-sparsom-moderat-uttalt* eller ved hjelp av skalaen *ikke påvist-få-moderat antall-mange*.

Stort prøveuttak er gjennomført sekvensielt på vaksinerte og uvaksinerte 1-åringer som fikk normalfôr (Tabell 12). Det ble på forhånd bestemt hvilke organer eller deler av fisken det skulle tas prøver fra, det vil si rutineprøver.

For å kunne fange opp tidlige og sparsomme patologiske forandringer uten melanin ble det tatt prøver fra to steder i skjelettmuskulaturen. For det første, fra fremre del av bukveggen i et område (MB) der melaninflekker ofte forekommer, og videre fra ryggmuskulaturen mellom hodet og ryggfinnen som en kontroll.

Siden årsaken er ukjent, og siden patologiske forandringer i muskulatur kan tenkes å være en del av et større bilde med forandringer også i andre organer, ble det i tillegg tatt en del andre prøver. Slike prøver er også nyttige med tanke på eventuelle sykdomsproblemer som måtte oppstå i forsøksperioden, noe som skjedde.

Rutineprøvene inkluderer derfor også øyne, thymus, pseudobrankie, gjeller, hjerte, lever, pankreas/midttarm, baktarm, milt, hode- og midtnyre, rød og hvit muskulatur til sides for ryggfinnen, samt blodprøver. Verdien av disse prøvene viser seg nå, ved at vi også undersøker hjerte og rød/hvit muskulatur for eventuelle HSMB-relaterte forandringer.

Tilleggsprøvene var fra og ved siden av melaninflekker. Det ble tatt prøver av mange flekker, og uansett hvor de fantes i muskulaturen.

Redusert prøveuttak er benyttet for alle andre grupper av 1-åringer og for alle 0-åringene (Tabell 13 og Tabell 14). Rutineprøvene inkluderte muskel fra bukvegg (MB) og rygg som nevnt over. Dessuten, da det etter hvert viste seg at flekkene oftest forekom langt dorsalt og lenger bak i bukveggen (MD), ble det i tillegg – ved de to siste uttakene fra 0-åringer - tatt prøver (tverr- og lengdesnitt) fra dette tredje området. Andre prøver inkluderte gjelle, lever og midtnyre, og varierende fra gang til gang også øye, pseudobrankie og hodenyre. Tilleggsprøver ble tatt fra og ved melaninflekker.

Tabell 11 Forsøksoppsett og prøvetaking av fisk (FV = ferskvann, SV = sjøvann).

1-åringer								
J.nr.	Prøvedato	Lok	Gruppe	Fôr	Uttaks- type	Nr.- serie	N fisk	N fisk for histologi
1 F13-13	03.04.2013	FV	Uvaks	Kontr	Stort	1-20	20	20
2 F13-24	30.05.2013	FV	Vaks, uvaks	Kontr	Stort	1-20	20	20
	31.05.2014	FV	Vaks	vit E, Zn	Red	21-60	40	0
3 F13-62	23.-24.09.2013	SV	Vaks, uvaks	Kontr	Stort	81-100	20	20
	23.-24.09.2013	SV	Vaks	vit E, Zn	Red	121-140	20	0
4 F13-80	06.01.2014	SV	Vaks, uvaks	Kontr	Stort	221-240	20	15
5 F14-13	25.03.2014	SV	Vaks, uvaks	Kontr	Stort	301-334	17	17
6 F14-26	04.06.2014	SV	Vaks, uvaks	Kontr	Stort	381-410	30	27
	04.-05.06.2014	SV	Vaks	Zn	Red	411-430	20	19
7 F14-74	19.-22.08.2014	SV	Vaks, uvaks	Kontr	Stort	441-470	30	27
	19.-22.08.2014	SV	Vaks	Zn, Cu, Anti	Red	471-530	30+15+15	54
0-åringer								
1 F13-37	07.08.2013	FV	Uvaks	Kontr	Red	61-80	20	0
2 F13-63	25.09.2013	FV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Kontr	Red	141-180	40	0
3 F13-76	06.01.2014	SV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Kontr	Red	181-220	40	19
4 F14-12	26.03.2014	SV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Kontr	Red	241-280	40	40
5 F14-25	03.06.2014	SV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Kontr	Red	341-380	40	37
6 F14-108	10.-11.12.2014	SV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Kontr	Red	531-568	32	32
7 F15/86	18.-19.03.2015	SV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Kontr	Red	902-915, 932-946	32	32
7 F15/86	18.-19.03.2015	SV	Vaks, uvaks: 8 & 16°C	Antioks	Red	918-930, 948-960	28	28

Tabell 12 Stort prøveuttak 1-åringer. Oversikten viser hvilke prøver som er tatt og hvordan de er håndtert i felt (R = rutineprøver, T = tilleggsprøver). Utenom nevnte rutine- og tilleggsprøver ble det også, i forbindelse med vaksineindusert betennelse, tatt prøver av bukvegg og/eller bukorganer fra en del fisk.

Organ el. Vev		Formalin	RNA/ater	Kryoblokk	Glut
Blodprøve	R				Serum
Ryggmuskel ¹⁾	R	x	x		
Bukmuskel ²⁾	R	x	x		
Buk- og ryggm. ³⁾	R	x			
Øye	R	x			
Thymus	R	x	x	x	
Pseudobranchie	R	x			
Gjeller	R	x	x	x	
Hjerte	R	x			
Lever	R	x	x		
Pankreas/midttarm		x			
Baktarm		x	X		
Milt	R	x	X		
Hodenyre	R	x	X		
Midtnyre		x			
Melaninflekker ⁴⁾	T	x	x	x	
Melaninflekker ⁵⁾	T	x	x		x

1) Cirka midt mellom hode og ryggfinne og midt mellom sidelinje og dorsal kontur: 2 biter lengde- og 2 biter tverrsnitt på formalin, 1 bit av hvit muskulatur på RNA/ater.

2) Ventralt for 1) tatt 2 biter lengde- og 2 biter tverrsnitt på formalin, 1 avlang bit mellom lengdesnittene preservert som kryoblokk, og 1 bit av hvit muskulatur på RNA/ater.

3) 2 biter fra nivå framkant av ryggfinne og på tvers av sidelinjen (like mye vev over som under). Inkluderer både hypaksial muskulatur (nærmere bestemt øverste del av bukmuskel) og epaksial muskulatur (nærmere bestemt nederste del ryggmuskulatur).

4) Gjelder tilleggsprøver ved 5. prøveuttak i 2014. Formalin eller formalin, RNA/ater og kryoblokk

5) Gjelder tilleggsprøver ved 7. prøveuttak i august 2014.

Tabell 13 Redusert prøveuttak 1-åringer. Oversikten viser hvilke prøver som er tatt og hvordan de er håndtert i felt (R = rutineprøver, T = tilleggsprøver). Utenom nevnte rutine- og tilleggsprøver ble det også, i forbindelse med vaksineindusert betennelse, tatt prøver av bukvegg og/eller bukorganer fra en del fisk.

Organ el. Vev		Formalin	RNAlater	Kryoblokk	Glut	
Blodprøve	R					Serum
Ryggmuskel (MR) ¹⁾	R	x	x			
Bukmuskel (MB) ²⁾	R	x	x			
Øye ³⁾	R	x				
Pseudobranchie ³⁾	R	x				
Gjeller	R	x				
Lever	R	x	x			
Midtnyre	R	x				
Melaninflekker ⁴⁾	T	x	x	x		
Melaninflekker ⁵⁾	T	x				
Melaninflekker ⁶⁾	T	x	x		x	

1) Ca. midt mellom hode og ryggfinne og midt mellom sidelinje og dorsal kontur: 1 bit lengde- og 1 bit tverrsnitt på formalin, 1 bit av hvit muskulatur på RNAlater.

2) Ventralt for 1) tatt 1 bit lengde- og 1 bit tverrsnitt på formalin, og 1 bit av hvit muskulatur på RNAlater.

3) Formalinfiksert ved 3., 4. og 6. uttaket.

4) Gjelder tilleggsprøver ved 5. uttak i mars 2014

5) Gjelder tilleggsprøver ved 6. uttak i juni 2014

6) Gjelder tilleggsprøver ved 7. uttak i august 2014

Tabell 14 Redusert prøveuttak 0-åringer. Oversikten viser hvilke prøver som er tatt. Gjelder første uttak (utført på fisk sendt på is til Ås), og 2.-7. uttak (utført i felt). Utenom nevnte rutine- og tilleggsprøver ble det også, i forbindelse med vaksineindusert betennelse, tatt prøver av bukvegg og/eller bukorganer fra en del fisk.

Organ el. vev		Formalin	RNAlater	Kryoblokk	Glut	
Blodprøve	R					Serum
Ryggmuskel (MR) ¹⁾	R	x	x			
Bukmuskel (MB) ²⁾	R	x	x			
Bukmuskel (MD) ³⁾	R	x	x			
Øye ⁴⁾	R	x				
Pseudobranchie ⁴⁾	R	x				
Gjeller	R	x				
Lever	R	x	x			
Hodenyre ⁵⁾	R	x	x			
Midtnyre	R	x				
Melaninflekker ⁴⁾	T	x	x	x		

1) Cirka midt mellom hode og ryggfinne og midt mellom sidelinje og dorsal kontur: 1 bit lengde- og 1 bit tverrsnitt på formalin (alle uttak), 1 bit av hvit muskulatur på RNAlater (2.-7. uttak).

2) Ventralt for 1) tatt 1 bit lengde- og 1 bit tverrsnitt på formalin (alle uttak), og 1 bit av hvit muskulatur på RNAlater (2.-7. uttak).

3) Denne gjelder bare uttakene av 0-åringer i desember 2014 og mars 2015. Det ble fra området helt dorsalt i bukveggen (på største fisken cirka 2 cm under sidelinjen) og på nivå med framkant av ryggfinnen tatt 1 bit på formalin og 1 bit på RNAlater.

4) Tatt prøver ved 2. - 6. uttaket.

5) Tilleggsprøver tatt prøver ved 6. uttaket.

4) Gjelder 6. uttak i desember 2014.

10.1.1 Bearbeidelse og undersøkelse av rutine- og tilleggsprøver – histologi

Formalinfiksert materiale er rutinemessig prosessert for histologiske undersøkelser. Fra parafin-innstøpt materiale er det skåret snitt som er farge med hemalum («hematoksylin») og eosin, og som er vurdert ved hjelp av lysmikroskopi.

Denne histologiske undersøkelsen er utført på bukvegg fra det faste prøvestedet langt foran i bukveggen (MB), og i tillegg på det tredje stedet i bukveggen (MD) fra de to siste uttakene av 0-åringer. De fleste snittene gjennom hele bukveggen inneholder alle disse vevene eller strukturene (Figur 49): Hud, underhud, rød og hvit muskulatur, fettvev, bindevev og bindevevshinner, ribben, blodkar, nerver og bukhinne. Blodkar, bindevev, nerver og fettvev er til stede nesten over alt. Det er ved mikroskoperingen fokusert mest på selve muskulaturen, det vil si myomere og myosepta, men de andre vevene eller strukturene er også vurdert.

Få gjeller er undersøkt da det en periode var mange fisk med store gjelleforandringer. Vev med melaninflekker samt kontrollvev er behandlet og undersøkt histologisk som beskrevet over.

10.1.2 Undersøkelse av rutine- og tilleggsprøver – molekylærbiologi

Det er undersøkt materiale på RNA/ater fra det siste uttaket av 1-åringer (7. uttak i august 2014, 14/74) og fra det neste siste uttaket av 0-åringer (6. uttak i desember 2014, 14/108). Materialet inkluderer prøver fra melaninflekker (sentrum og eventuelt fra utkant) og fra tilsynelatende normalt vev noen centimeter ifra flekken (kontroll). Videre er det skilt mellom myomere og myosepta.

RNA-ekstraksjon ble utført ved hjelp av TRIZOL (Invitrogen) og NucleoSpin RNAII (Macherey & Nagel) inkludert integrert DNase-trinn. Ekstrahert RNA ble kvantifisert spektrofotometrisk (Biospec-Nano) og lagret ved minus 80 °C. Revers transkripsjon ble utført med 1 µg RNA/reaksjon og M-MLV revers transkriptase (Promega). Syntesen ble igangsatt med oligo(dt), tilfeldig hexamer og RNase-hemmer. Kvantitativ real-time PCR ble utført i et 7900HT fast real-time PCR-system (Applied Biosystems Carlsbad) i henhold til produsentens instruksjoner. 10 minutter ved 95 °C fulgt av 40 syklus på 15 s ved 95 °C, 15 s ved 58 °C og 60 s ved 60 °C. Triplikater med 13 µl reaksjonsvolum inkludert TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) og cDNA-templat tilsvarende 5 ng RNA. Ekspresjonsnivået ble normalisert ved hjelp av elongation factor 1A (EF1A) som referansegene.

Det er undersøkt for uttrykk av MHC I, MHC II, CD4, CD8, viperin, tyrosinase og RIG-I.

10.1.3 Undersøkelse av blodprøver – enzymer i serum

Blodprøvene ble tatt på vacutainere (VACUETTE® Serum Collection Tubes by Greiner Bio-One, VACUETTE® Serum Tubes with Clot Activator, Gel Separator). Ved dagens slutt ble prøvene sentrifugert og serum frosset.

Serum fra de fleste 1-åringene som fikk normalfôr, inkludert alle uttakene i fersk- og sjøvann, ble analysert for AST (aspartataminotransferase, ASAT), ALT (alaninaminotransferase, ALAT) og CK (kreatin-kinase) ved Sentrallaboratoriet på NMBU Veterinærhøgskolen (Adamstua, <http://www.sentrallaboratoriet.no/>). Økte nivåer av disse enzymene kan indikere celledskade i ulike organer eller vev.

10.1.4 Undersøkelse av blodprøver - Piscine orthoreovirus (PRV)

Det ble tatt blodprøver fra kaudalkarene for påvisning av eventuell PRV-infeksjon fra det siste uttaket av 0-åringer i mars 2015. Erythrocytter ble isolert og videre ble det kjørt en prosedyre for isolering av PRV-RNA etter tidligere publisert metode (Finstad *et al.*, 2014). PRV infiserer røde blodlegemer hos laks. Siden virus replikerer i erythrocytter, er det perifert blod som er det beste vevet for påvisning av eventuell infeksjon.

10.1.5 Materiale i kryoblokker eller fiksert på glutaraldehyd

Disse vurderes undersøkt når de andre resultatene foreligger.

10.2 Resultater – 1-åringer som fikk normalfôr - patologi

10.2.1 Laks i ferskvann - patologiske forandringer

Kronisk bukhinnebetennelse utviklet seg etter hvert hos samtlige av de vaksinerte individene.

10.2.2 Laks i sjøvann - patologiske forandringer utenom muskulatur

Et utbrudd av kardiomyopatisyndrom (CMS) hos fisk spesielt i en merd (sjøvann) ble forsommeren i 2014 diagnostisert av den lokale fiskehelsetjenesten. Hos 10 fisk fra det siste uttaket, like mange vaksinerte som uvaksinerte, ble det undersøkt hjerte og rød pluss hvit muskulatur i forkant av ryggfinnen. Alle hadde i forkammer og kammer endo- og myokarditt, som hos de fleste var sparsomt til stede. Disse funnene er forenlige med CMS. Det var en svært sparsom betennelse i rød muskulatur hos over halvparten.

Hos en del fisk ble det påvist enkelt- eller dobbeltsidig katarakt. Hos vaksinert fisk var det etter hvert vanlig med kronisk peritonitt i bukhinnen over organene (viscerale peritoneum) og i bukveggens hinne (parietale peritoneum). Makroskopisk såes fibrøse adheranser innbyrdes mellom organer og mellom disse og bukveggens bukhinne, og det var ofte melanin til stede.

Forandringene ved peritonitt var dominert av innslag av makrofag-lignende celler og lymfocytter, i mer kroniske tilfeller, vurdert ut på bakgrunn av et større innslag av fibrocytter og fibroblaster, fantes også melanomakrofager. Forandringene angikk i svært liten grad underliggende muskulatur, men peritoneum og det underliggende laget med fettvev var affisert. For øvrig ble det ikke påvist noen sikker sammenheng mellom disse og patologiske forandringer i undersøkt muskulatur.

De fleste fiskene (26 av 30) hadde ved det syvende uttaket i august 2014 gjelleforandringer. Hos de fleste var de sparsomme til moderate, men hos noen få fisk uttalte. Makroskopisk var de mest distale delene av de mer ventrale filamentene lyse gulhvite, og histologisk fantes en uttalt epitelhyperplasi og infiltrasjon med betennesceller spesielt i subepiteliale vev. Noe etiologisk agens kunne ikke påvises ved rutinehistologisk undersøkelse, og årsaken er ukjent. Vi vurderer det slik at disse forandringene ikke var av en slik karakter at de kunne gi opphav til alvorlige forstyrrelser i gjellefunksjonen.

10.2.3 Laks i sjøvann - patologiske forandringer i muskulatur

Hos det store flertall av fiskene ble det ikke observert makropatologiske muskulære forandringer ved obduksjon. Men melaninflekker, alle størrelser og lokaliseringer inkludert, ble makroskopisk påvist i 8

av 157 fisker, som inkluderer alle undersøkte fra både fersk- og sjøvann (Tabell 15). Halvparten av fiskene med flekker var henholdsvis vaksinert og uvaksinert. Alle flekkene ble påvist hos fisk som ble undersøkte det siste halvåret i sjøen. Sidene tallene er så lave kan det ikke ut fra akkurat dette materialet konkluderes om forekomst.

Histologisk karakterisering av melaninflekkene

Den histologiske karakteriseringen av de mørke flekkene ga omtrent samme bildet som det som er beskrevet tidligere utført på feltmateriale innsamlet fra forskjellige oppdrettere. Fellesnevneren er en interstitiell betennelse med melanomakrofager og fibrose. I tillegg var bildet ofte dominert av en kronisk polyfasisk nekrotiserende muskelbetennelse. Iblant ble det observert store ekstracellulære vakuoler i affisert muskulatur. Disse var som regel omgitt av ringer av melanomakrofager. I de mer akutte områdene var det lite med melanomakrofager, men bildet var dominert av nekrotiserte myocytter med eosinofile tverrbånd (diskoid henfall, degenerasjon) og varierende grad av infiltrasjon av makrofag-lignende celler. I mer kroniske områder var det rikelig med fibrocytter og melanomakrofager, og stedvis fantes også granulomer med innhold av makrofag-lignende celler og omgitt av melanomakrofager. Frekvensen av melanomakrofager i forandringene var varierende i forhold til hvor i dem man var. Sentralt var det som regel mye melanin, men mer perifert var det mindre. I de mindre flekkene (under 0,5 cm i dm) var det ofte ingen granulomer å observere, men derimot en granulomatøs betennelse dominert av fibrocytter og melanomakrofager. I alle tilfeller ble det som tidligere beskrevet funnet fire typer av forandringer i hvit muskulatur; nemlig degenerte (døde) muskelceller, døde muskelceller infiltrert av betennelsesceller som var makrofag-lignende, regenerasjon av hvite muskelceller, og kronisk interstitiell betennelse med varierende antall melaninholdige celler.

På grunnlag av disse funnene kan vi konkludere med at forsøksfisken utviklet klassiske melaninflekker som observert og beskrevet ved tidligere uttak fra feltmateriale.

Histologisk karakterisering av muskeldegenerasjon og betennelse uten melanin

Døde (degenererte) hvite muskelceller infiltrerte av makrofag-lignende celler (Figur 50), men uten melanomakrofager, ble observert hos 8 av 146 fisk, og likelig fordelt mellom vaksinert og uvaksinert fisk (Tabell 15). Men de fleste ble funnet det siste halvåret i sjøen, og hos en av disse fiskene ble det påvist melaninflekk. Disse funnene ble observert i fremre del av bukveggen som svært sparsomme forandringer, hvor det i hvert snitt vanligvis kunne sees en eller to hvite muskelceller med disse forandringene. Selv om det ikke ble observert involvering av melanomakrofager i disse forandringene, hadde de likevel store likheter med den muskeldegenerasjonen og betennelsen som fantes særlig perifert i melaninflekkene der innslaget av melanomakrofager var sparsomt eller fraværende.

Så selv forandringene i dette materialet syntes å forekomme uavhengig av melaninflekker mener vi likevel, basert på patologien, at vi kan fremsette en teori om utviklingen av de svarte flekkene. Minst en form må kunne dannes på følgende måte: Muskeldegenerasjon som følges av en akutt betennelse som videre følges av en kronisk betennelse dominert av melanomakrofager (Figur 51). Årsaken til melaninflekkenes dannelse må derfor finnes i årsakene som forårsaker muskeldegenerasjon.

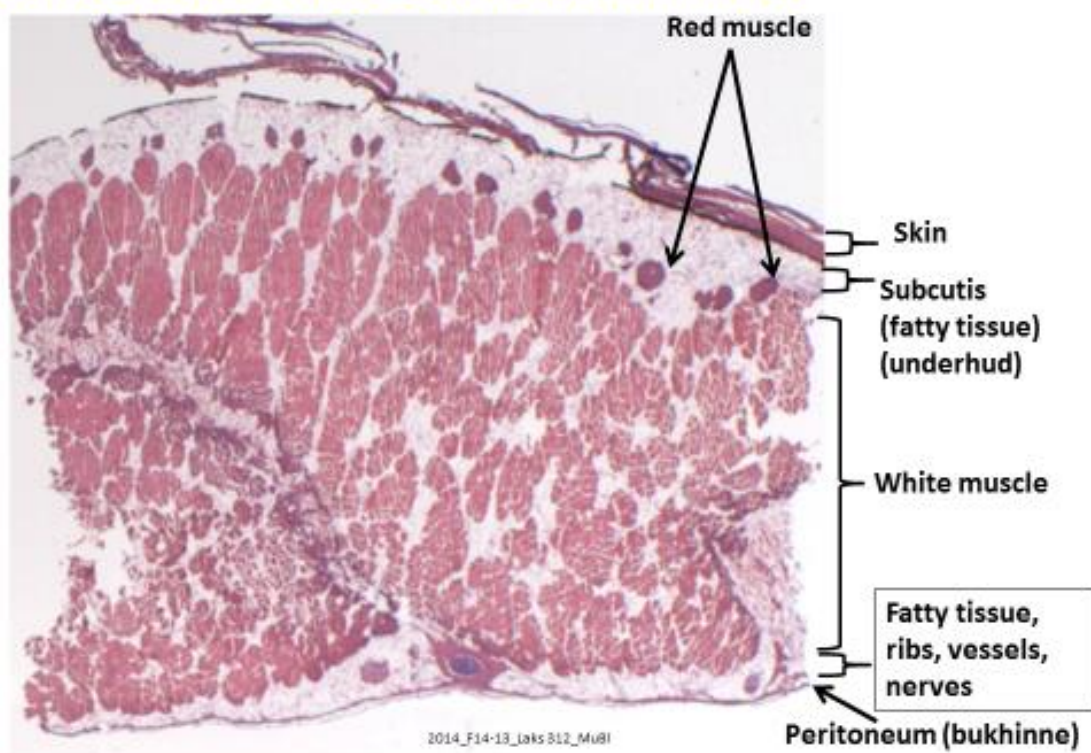
Tabell 15 De viktigste patologiske forandringene i hvit muskulatur hos 1-åringer som fikk normalfôr.

Prøvetakingstid	Makroskopisk: Melaninflekker		Histologisk: Degenerasjon & myositt i hvit bukmuskulatur	
	Uvaksinert	Vaksinert	Uvaksinert	Vaksinert
1 – 2013 apr	0/20	-	0/20	-
2 – 2013 mai	0/10	0/10	0/10	0/10
3 – 2013 sep	0/10	0/10	1/10	0/10
4 - 2014 jan	0/10	0/10	0/7	0/8
5 - 2014 mar	0/7	2/10	0/7	2/10 ¹⁾
6 - 2014 jun	1/15	1/15	3/14 ²⁾	1/13 ²⁾
7 - 2014 aug	3/15	1/15	0/13	1/14 ²⁾
Sum	87 fisk	70 fisk	81 fisk	65 fisk

1) Den ene fisken hadde en liten melaninflekk.

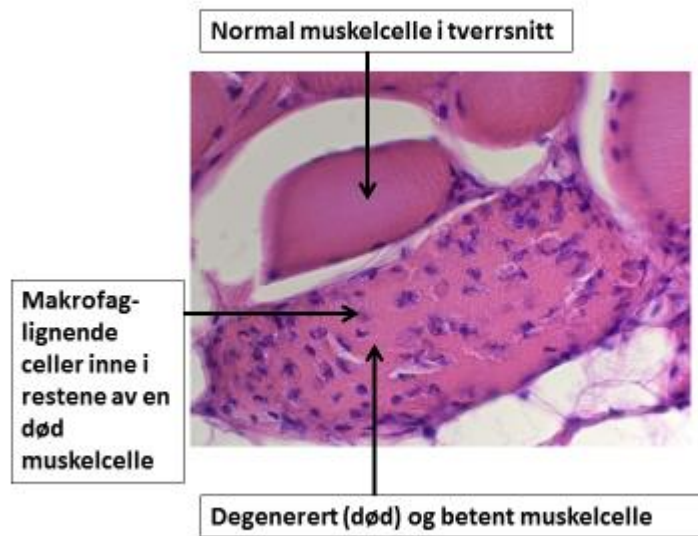
2) Melaninflekker ikke påvist hos noen av disse fiskene.

Snitt gjennom hel bukvegg uten påviste forandringer



Figur 49 Snitt gjennom hel bukvegg uten påviste forandringer.

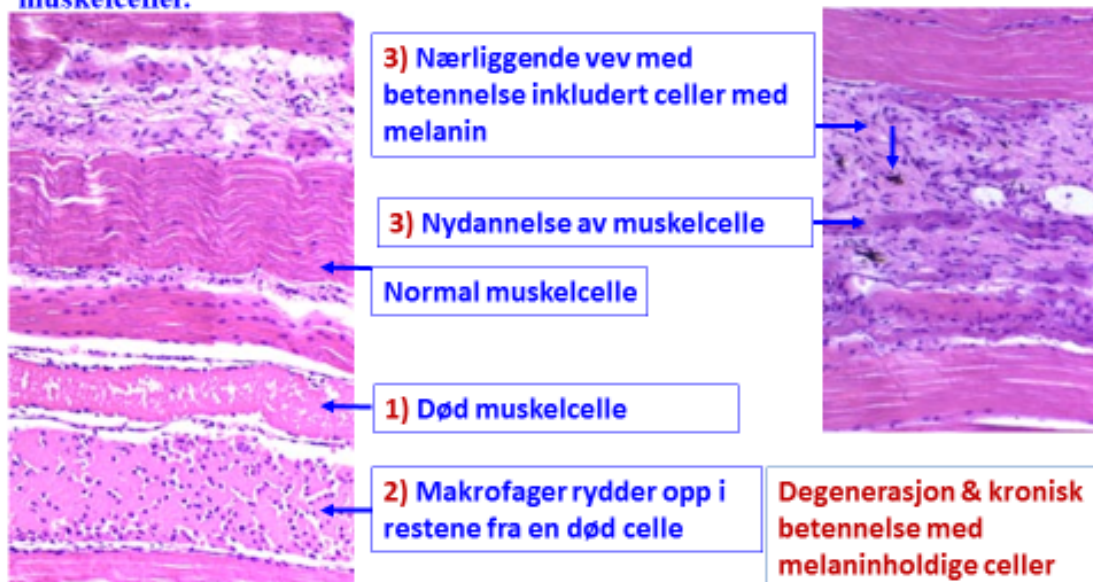
Sykdomsforandringer i hvit muskulatur



Figur 50 Sykdomsforandringer i hvit muskulatur.

Hvordan dannes mørke flekker?

Histologiske undersøkelser tyder på at det skjer i denne rekkefølgen: (1) muskelceller dør, (2) en type kvite blodlegemer (makrofager) invaderer disse cellene og rydder opp, (3) i nærliggende vev oppstår kronisk betennelse med melanomakrofager, som gjør at det ser svart ut. Her kan det også dannes nye muskelceller.



Figur 51 Mulig patogenese.

10.3 Resultater – 1-åringer som fikk ulike spesialfôr

Også hos disse ble det i andre organer enn muskulatur påvist ovenfor nevnte patologiske forandringer. Makroskopiske og histologiske forandringer, det vil si melaninflekker og degenerasjon & myositt, var som beskrevet over for 1-åringene. Det histologiske bildet divergerte ikke med henblikk på hva slags spesialfôr som var gitt, men frekvensen av melaninflekker og muskeldegenerasjoner/myositt kunne variere (Tabell 16).

Tabell 16 De viktigste patologiske forandringene i hvit muskulatur hos vaksinerte 1-åringer som fikk spesialfôr. Det er kun undersøkt fisk fra de angitte tidspunkter. i.u. = ikke undersøkt.

Prøvetakingstid	Makroskopisk: Melaninflekker			Histologisk: Degenerasjon & myositt i hvit bukmuskulatur		
	Zn	Cu	Antioks	Zn	Cu	Antioks
6 - 2014 Jun	1/20	-	-	5/19 ¹⁾	-	-
7 - 2014 Aug	6/30	1/15	1/15	6/26 ¹⁾	5/13 ²⁾	8/15 ²⁾

1) En av disse fikk påvist melaninflekk.

2) Ingen av disse fikk påvist melaninflekk.

Få fisker er undersøkt slik at de tallene er usikre, og det er kanskje usikkert om det har vært en økning fram til august 2014.

10.4 Resultater – 1-åringer som fikk normal eller spesialfôr – enzymer i blodplasma

Det er store individ-til-individ-variasjoner i enzymverdier, jamfør opplysninger i Tabell 19.

Men gjennomsnittene syner noe høye enzymverdier hos fisk i ferskvann og første høsten i sjøen. Ellers i juni 2014. Vitamin E-tilsetning i fôret ser ut til å gi lavere verdier.

Gjennomsnittsverdiene for AST (Figur 52) varierte mellom cirka 500 og 2.000 U/L. Gjennomsnitt hos frisk fisk i ferskvann er rapportert i størrelsesorden 700–900 U/L for røye (20 gram) (Edsall, 1999) og 1.600–1.800 U/L for voksen regnbueørret (Heydarnejad *et al.*, 2013).

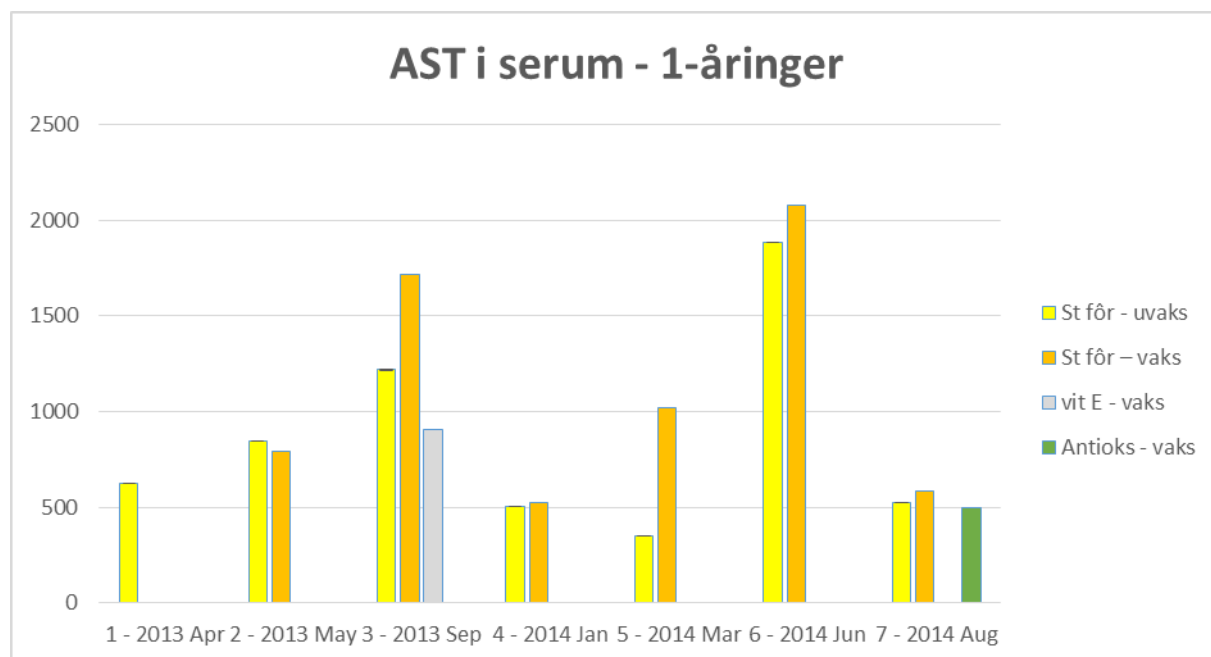
Gjennomsnittsverdiene for ALT (Figur 53) var høyest før vaksinering og avtok deretter. Den varierte mellom 175 og cirka 20 U/L. Enzymet finnes i lever og skjelettmuskulatur (Mommensen, 2004) og gjennomsnitt i blod hos frisk fisk i ferskvann er rapportert å være i størrelsesorden 22–36 U/L for røye (20 gram) (Edsall, 1999) og 120–170 U/L for voksen regnbueørret (Heydarnejad *et al.*, 2013). De målte verdiene synes således å samsvare med de rapporterte, med mulig unntak for fisk i ferskvann.

Nivået av CK i serum (Figur 54) var fra april 2013 til mars 2014 på et nivå under 9.000 U/L og nesten alle i sjøfasen under 5.000. Verdiene av samme størrelsesorden som funnet hos røye i ferskvann (Edsdal, 1999) og hos klinisk frisk laks i sjøoppdrett (Rodger *et al.*, 1991; Yousaf & Powell, 2012). De høye verdiene fra juni 2014 er av samme størrelsesorden som observert ved hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (Yousaf & Powell, 2012).

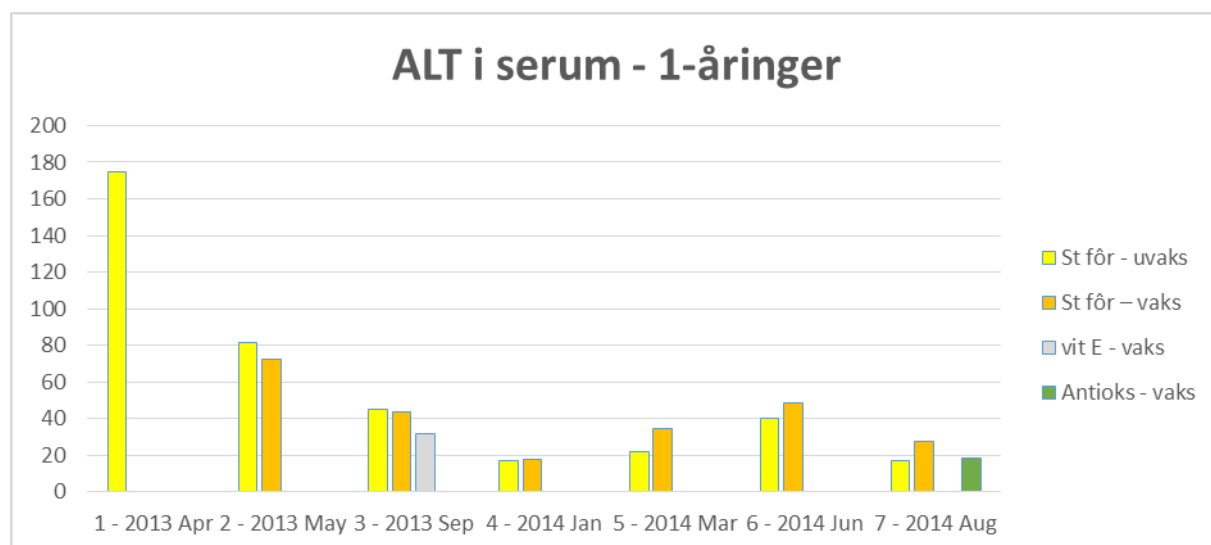
Det er nærliggende å se de høye verdiene fra juni 2014 i sammenheng med utbruddet av CMS selv om Yousaf & Powell (2012) i sitt materiale ikke påviste stigning. Og selv om det ikke ble tatt prøver av fisk

med CMS er det stor sannsynlighet for tilsvarende patologi også hos fisk uten kliniske tegn. Hos fisk fra august ble det påvist patologi forenlig med CMS.

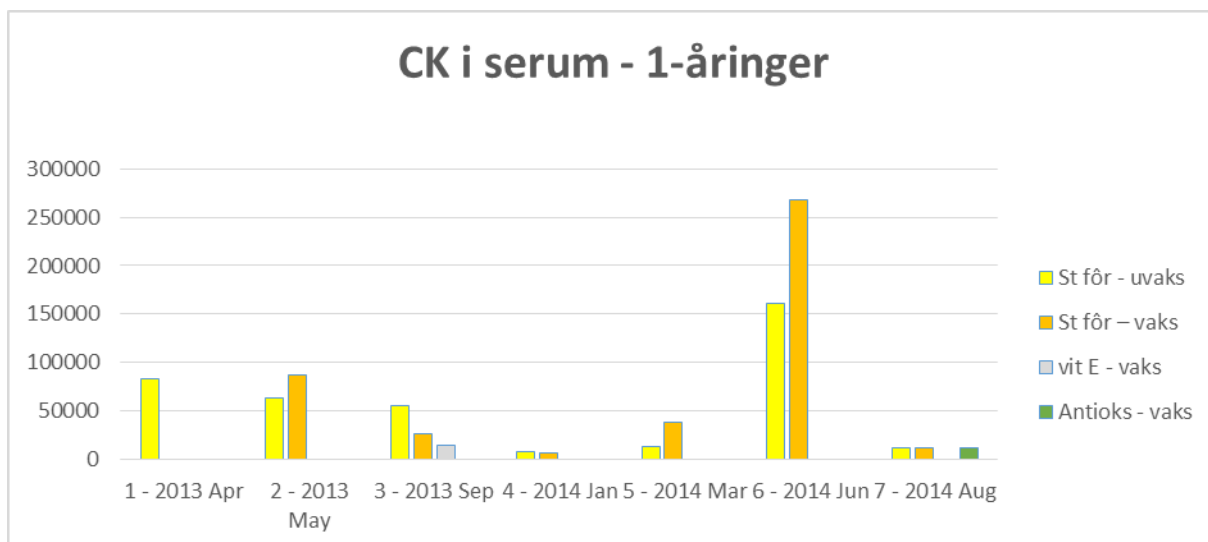
Resultatene fra enzymmålingene er sammenholdt med patologiske forandringer (melaninflekker og degenerasjon med betennelsesceller) i hvit muskulatur. Ingen umiddelbar sammenheng peker seg ut mellom disse og enzymverdiene når vaksinert og uvaksinert fisk vurderes samlet. Siden det er få fisk med forandringer vil en oppsplitting på vaksinert og uvaksinert gi veldig lave antall.



Figur 52 Aktivitet (antall enheter U/L på vertikal akse) for enzymet AST (aspartataminotransferase) i serum fra 1-åringer gjennom forsøket.



Figur 53 Aktivitet (antall enheter U/L på vertikal akse) for enzymet ALT (alaninaminotransferase) i serum fra 1-åringer gjennom forsøket.



Figur 54 Aktivitet (antall enheter U/L på vertikal akse) for enzymet CK (kreatin-kinase) i serum fra 1-åringer gjennom forsøket.

10.5 Resultater – 0-åringer

10.5.1 Patologiske forandringer

Også her var det sekvensielle uttak (Tabell 17 og Tabell 18). Hos endel fisk ble det makroskopisk påvist enkelt- eller dobbeltsidig katarakt. Hos vaksinert fisk var det vanlig med etter hvert kronisk peritonitt inkludert fibrøse adheanser innbyrdes mellom organer og mellom disse og innvendig bukvegg. PIT-merkene ble hos en del fisk funnet inne i svømmeblæren. Hvor de lå i bukhinnehulrommet var det assosiert med peritonitt som i de fleste tilfeller var sparsom.

Ved det sjette og nest siste uttaket i desember 2014 ble det hos seks av 32 fisk observert sparsomme til moderate gjelleforandringer som beskrevet ovenfor hos 1-åringene.

Makroskopiske og histologiske forandringer, det vil si degenerasjon & myositt og melaninflekker, var som beskrevet for 1-åringene (Tabell 17 og Tabell 18).

Degenerasjon & myositt i hvite muskelceller

Ved en sammenligning mellom bukmuskel MB (opprinnelig fast prøvested) og MD (fast prøvested i tillegg på de to siste uttakene) ble degenerasjon & myositt hyppigst påvist i førstnevnte, henholdsvis 9 og 4 fisk.

Det ser ut til at forekomsten av hvite muskelceller som er degenerte og infiltrerte med makrofag-lignende celler var høyest i mars 2014 og i desember 2014.

Melaninflekker

Det er først ved uttakene i desember 2014 og mars 2015 at det ble påvist en del melaninflekker i hvit muskulatur.

Det er så langt undersøkt melaninflekker fra fisk fra det sjette uttaket i desember. Og all fisk fra mars 2014.

Tabell 17 De viktigste patologiske forandringene i hvit muskulatur hos 0-åringer som fikk normalfôr (i.u. = ikke undersøkt).

Prøvetakingstid	Melaninflekker i muskulatur				Degenerasjon & myositt i hvit bukmuskulatur			
	Uvaksinert		Vaksinert		Uvaksinert		Vaksinert	
	8 °C	16 °C	8 °C	16 °C	8 °C	16 °C	8 °C	16 °C
1 – 2013 aug	0/10	0/10	-	-	i.u.	i.u.	-	-
2 – 2013 sep	0/10	0/10	0/10	0/10	i.u.	i.u.	i.u.	i.u.
3 – 2014 jan	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/5	0/4
4 - 2014 mar	1/10	0/10	0/10	0/10	3/10	3/10	2/10	2/10
5 - 2014 jun	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/9	0/9	2/9
6 - 2014 des	2/8	5/8	2/8	4/8	1/8 ¹⁾	3/8 ²⁾	3/8 ³⁾	2/8 ⁴⁾
7 - 2014 mar M ⁵⁾	0/4	0/4	3/4	1/4	1/4 ⁷⁾	1/4 ⁸⁾	1/4 ⁹⁾	0/4
7 - 2014 mar H ⁶⁾	3/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4 ¹⁰⁾
	66	66	56	56	41	40	40	35

1) I prøve tatt på vanlig sted i bukveggen (MB) hos fisk uten påvist melaninflekk.

2) Disse tre fiskene hadde også melaninflekker. Forandringene fantes i MD hos en fisk og i MB hos de to andre.

3) Forandringer i henholdsvis MB og MD hos henholdsvis 1 og 3 fisker, og en av sistnevnte hadde en melaninflekk.

4) Begge fiskene hadde både forandringer i MB og flekker.

5) Medium tetthet av fisk.

6) Høy tetthet av fisk

7) I prøve MD.

8) I prøve MB.

9) I prøve MB hos fisk som også hadde melaninflekk annet sted.

10) I prøve MB.

Tabell 18 De viktigste patologiske forandringene i hvit muskulatur hos 0-åringer som fikk spesialfôr (i.u. = ikke undersøkt).

Prøvetakingstid	Melaninflekker				Degenerasjon & myositt i hvit bukmuskulatur			
	Uvaksinert		Vaksinert		Uvaksinert		Vaksinert	
	8 °C	16 °C	8 °C	16 °C	8 °C	16 °C	8 °C	16 °C
7 - 2014 mar M ¹⁾	0/4	0/4	2/4	1/4	1/4 ³⁾	1/4 ³⁾	0/4	1/4 ⁴⁾
7 - 2014 mar H ²⁾	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

1) Medium tetthet av fisk.

2) Høy tetthet av fisk

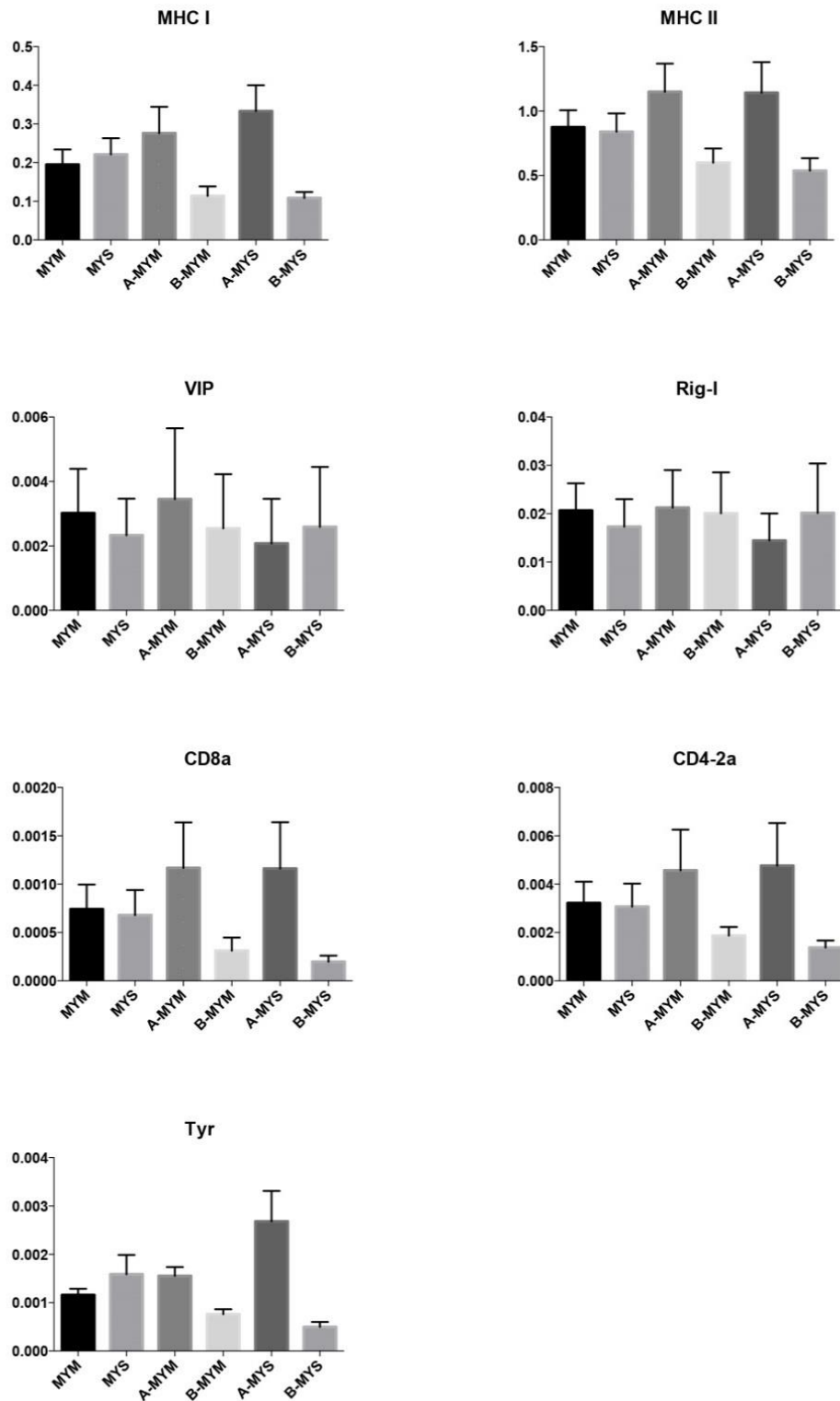
3) I prøver fra MB

4) I prøve MB. Ikke hos den fisken med påvist melaninflekk.

10.6 Resultater – 0- og 1-åringer som fikk normalfôr – PCR

Vev fra midten og utkanten til melaninflekker, og fra tilsynelatende normalt vev noen centimeter ifra, ble undersøkt. Resultatene viser høyere uttrykk av transkripter for MHC I, MHC II, CD4 og CD8 i melaninflekker sammenlignet med tilsynelatende normalt muskelvev (Figur 55). Dette gjelder for prøver fra både myosepta og myomerer. Resultatene indikerer antigen prosessering i både MHC I- og II-veien, noe som støttes av høyere uttrykk for henholdsvis CD8 og CD4.

For viperin og RIG-I ble det ikke påvist tydelige forskjeller. Transkripter for tyrosinase var høyere uttrykt i melaninflekker sammenlignet med annet vev. Interessant er det at uttrykket var høyest i myosepta.



Figur 55 Genekspresjon for MHC I og II (major histocompatibility complex I og II), VIP (viperin), RIG-I (retinoic acid inducible gene-I), CD8a (cluster of differentiation 8a), CD2a og Tyr (Tyrosinase). A-MYM: Myomerer fra flekk (n=13), B-MYM: Myomerer utenfor flekk (n=13), A-MYS: Myosepta fra flekk (n=10), B-MYS: Myosepta utenfor flekk (n=10), MYM: Totalt antall myomer-prøver (n=26), MYS: Totalt antall myosepta-prøver (n=20).

10.7 Resultater – RT-qPCR for PRV

Samtlige testede blodprøver fra siste uttak av 0-åringer (15/86) var positive for PRV. Negative kontroller var negative.

10.8 Samlet vurdering og oppfølging

Det ble på steder i bukveggen hvor frekvensen av melaninflekker har vært spesielt høy (langt fremme (MB) og lenger bak og oppe (MD) hos relativt få fisk – uten flekker – påvist få hvite muskelceller som var degenererte og infiltrerte med makrofag-lignende betennelsesceller. Noen sikker forskjell mellom disse to stedene ble ikke påvist når det gjelder forekomsten av akkurat denne typen forandring.

Det er ikke påvist sammenheng mellom forekomstene av melaninflekker og denne patologien som kun gjelder hvite muskelceller, bortsett fra at sistnevnte type av patologi forekommer i mange melaninflekker. Derfor er det vår hypotese at det er en sammenheng.

Det histologiske bildet av melaninflekkene er tilsynelatende det samme uansett fiskens bakgrunn i forsøket og flekkenes lokalisering. I flekkene er det påvist interstitiell fibrose og betennelse med melanomakrofager, og i tillegg ofte degenerasjon og betennelse i hvite muskelceller, og regenerasjon av slike celler.

Høyere uttrykk av transkripter for henholdsvis MHC I og CD8, og MHC II og CD4, i melaninflekker indikerer en antigen-drevet betennelse. Det vil si at enten hele mikroorganismer eller noen av deres byggestener er til stede.

At uttrykket for tyrosinase var høyest i myosepta samsvarer med forventet patogenese, det vil si at melaninholdige celler forekommer i bindevev og kanskje først i myosepta.

Blodprøver fra siste uttak av 0-åringer viser at fisken er infisert med PRV, men vi kan ikke i dette materialet så langt fastslå en årsakssammenheng.

Fremtidig arbeid bør ta sikte på videre karakterisering av de patologiske forandringene og vurdere disse i forhold til sykdommer som HSMB og CMS, og i forhold til resultatene fra molekylære undersøkelser og forekomstene av enzymer i blodet. Rollen til PRV må avklares nærmere og det er aktuelt å undersøke også for andre mikroorganismer. Siden de initiale fasene i patogenesen er uklare, krever disse inngående studier med anvendelse av avanserte morfologiske teknikker som inkluderer elektronmikroskopi, immunoelektronmikroskopi og analyser av laserdissekert materiale i kombinasjon med transkripsjonsanalyser.

Tabell 19 Vedlegg

Prøvetaking	Uvaks el. uvaksinert		AST, U/L	ALT, U/L	CK, U/L
1 - 2013 Apr	Uvaks	Gj.snitt	627	175	82998
	Uvaks	Maks	2330	1070	397610
	Uvaks	Min	70	23	18660
2 - 2013 Mai	Vaks	Gj.snitt	793	73	87712
	Vaks	Maks	1833	181	372950
	Vaks	Min	372	26	9609
2 - 2013 Mai	Uvaks	Gj.snitt	845	82	63822
	Uvaks	Maks	1158	110	128833
	Uvaks	Min	537	47	24916
3 - 2013 Sep	Vaks	Gj.snitt	1719	44	26601
	Vaks	Maks	4840	110	61018
	Vaks	Min	385	16	7114
3 - 2013 Sep	Uvaks	Gj.snitt	1219	45	56269
	Uvaks	Maks	4260	107	236300
	Uvaks	Min	664	24	9851
3 - 2013 Sep	Vaks - vit E	Gj.snitt	903	32	14595
		Maks	2420	54	28460
		Min	400	19	5604
4 - 2014 Jan	Vaks	Gj.snitt	523	18	7582
	Vaks	Maks	912	23	22025
	Vaks	Min	303	11	2175
4 - 2014 Jan	Uvaks	Gj.snitt	506	17	8817
	Uvaks	Maks	1009	24	21710
	Uvaks	Min	293	12	2425
5 - 2014 Mar	Vaks	Gj.snitt	1022	35	38779
	Vaks	Maks	6485	149	252350
	Vaks	Min	290	16	6103
5 - 2014 Mar	Uvaks	Gj.snitt	352	22	13048
	Uvaks	Maks	489	26	27136
	Uvaks	Min	282	19	6676
6 - 2014 Jun	Vaks	Gj.snitt	2079	49	268384
	Vaks	Maks	7967	130	1604300
	Vaks	Min	584	25	19394
6 - 2014 Jun	Uvaks	Gj.snitt	1883	40	160938
	Uvaks	Maks	3638	68	569650
	Uvaks	Min	763	23	27149
7 - 2014 Aug	Vaks	Gj.snitt	585	28	12730
	Vaks	Maks	1227	77	34580
	Vaks	Min	399	15	4605
7 - 2014 Aug	Uvaks	Gj.snitt	523	17	12409
	Uvaks	Maks	885	25	61105
	Uvaks	Min	309	13	3761
7 - 2014 Aug	Vaks-antioks	Gj.snitt	498	18	11689
		Maks	662	26	37099
		Min	358	14	3235

11 Resultater – avl

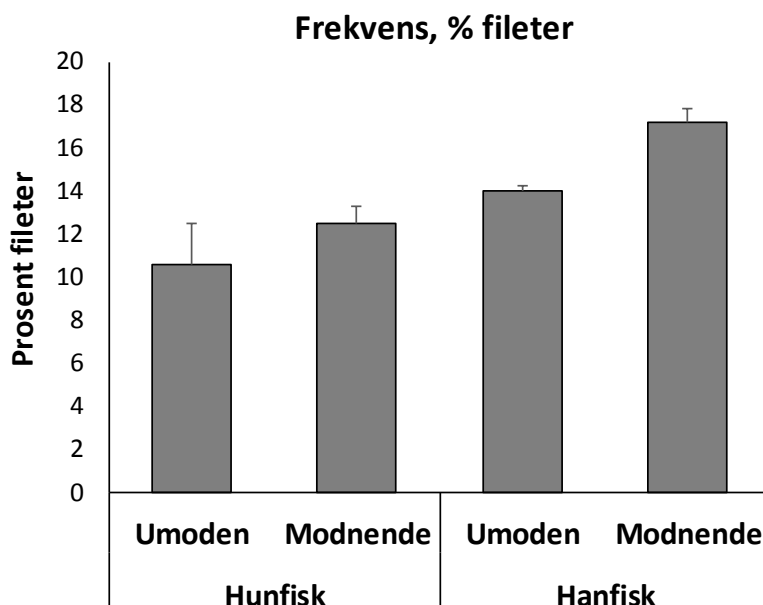
Forfattere: Turid Mørkøre og Bjarne Gjerde

Det er dokumentert at melaninisering av bukhinnen hos laks viser arvelig variasjon. Det betyr at det er mulig å styre denne egenskapen i ønsket retning gjennom målrettet avlsarbeid. For å undersøke om mørke flekker i filet viser arvelig variasjon gjorde vi registreringer av fisk fra en avlspopulasjon (SalmoBreed), 20 fisk fra hver av 100 familier. All fisken ble filetert, og filetene ble scoret for flekker i henhold til FHF standarden.

Resultatene viste svært lav arvelig variasjon for mørke filetflekker i dette fiskematerialet ($h^2 = 0.01-0.02$). Ut fra disse resultatene ser målrettet avlsarbeid ikke ut til å være en effektiv måte å redusere problemet med mørke flekker. Laksen i forsøket var holdt ved periodevis høy eller lav strøm gjennom sjøfasen. Det var ingen effekt av strøm på forekomsten av mørke flekker men filtene av laks holdt ved høy strøm hadde mindre spalting (gaping).

Resultatene viste betydelige kjønnsforskjeller med høyere grad av mørkpigmentering av filet i hanfisk. For begge kjønn økte graden av mørkpigmentering i modnende fisk (Figur 56). Det er kjent at kjønns hormoner kan påvirke melaninsyntese, men det er også viktig å utelukke involvering av andre faktorer. For eksempel aktiv infeksjon av bærertilstand av mikroorganismer.

I tillegg til å gjøre et omfattende registreringsarbeid, ble forekomst av mørke flekker sammenholdt opp mot motstandsevne for smitte av ulike virus på familiebasis for en annen avlspopulasjon. Vi fant sammenheng mellom motstandsevne mot IPN smitte og økt forekomst av mørke flekker. Materialet som ble undersøkt var imidlertid begrenset til 20 familier.



Figur 56 Prosent fileter med mørke flekker.

11.1 Konklusjon og oppfølging

- Resultatene viste svært lav arvelig variasjon for mørke filetflekkeer hvilket betyr at det ikke er mulig å oppnå vesentlig reduksjon av mørke flekker gjennom målrettet avlsarbeid
- Hanfisk høyere forekomst enn hunfisk
- Modnende fisk høyere forekomst enn umoden fisk
- Sammenheng mellom motstandsevne mot IPN smitte og forekomst av mørke flekker

Det kan være betenkelig å avskrive avl som et langsiktig tiltak for å begrense forekomsten av mørke flekker basert på èn studie. Resultatene som viser sammenheng mellom IPN smitte og forekomst av mørke flekker var innenfor et begrenset materiale og bør følges opp for å avdekke om laks med sterk motstandskraft mot IPN eventuelt andre virus/patogener har større tendens til å utvikle mørke flekker.

12 Resultater - stress og skader

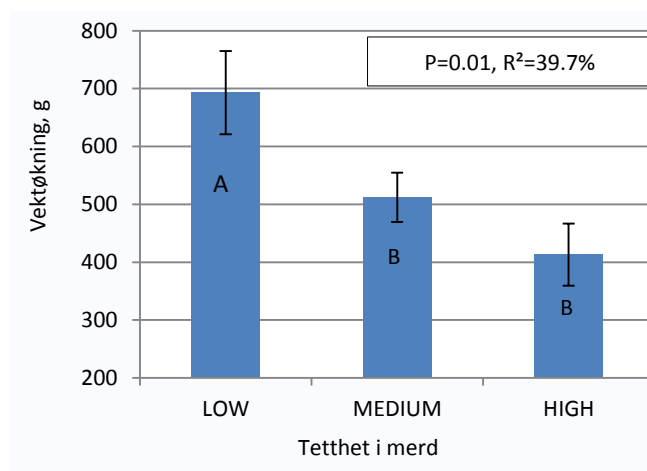
Forfattere: Turid Mørkøre, Magnus Åsli og Thomas Larsson

Effekt av stress og muskelskader på utvikling av mørke flekker ble undersøkt.

Vi utførte ulike innledende studier i prosjektet for å undersøke om stress og muskelskader kan føre til utvikling av mørke flekker. Undersøkelser var godkjente av Mattilsynet og ble utført under kontrollerte betingelser, av forskere med bestått kurs i dyrevelferd.

12.1 Tetthet i merd

Betydningen av tetthet i merd ble undersøkt i småskalaforsøk, som en integrert faktor i et fôringsforsøk. Tetthet i forhold til kg/m³ kan ikke overføres direkte til kommersielle betingelser, men effekten av tetthet er dokumentert ved vektøkning i forsøksperioden på to måneder (Figur 57). Høy tetthet i en to måneders periode før slakt hadde ingen effekt på forekomsten på mørke flekker i filet og det var heller ingen forskjell i melanisering av bukhinne eller organer.



Figur 57 Vektutvikling for laks holdt ved henholdsvis lav, medium og høy tetthet (9 merder per tetthet).

12.2 Vannkvalitet

Det er kjent at lavt oksygeninnivå fremmer infeksjoner og hemmer sårheling (bl.a. epitelisering). Lavt oksygeninnivå kan også føre til at sår under heling sprekker opp.

For å undersøke om vannkvaliteten kan påvirke utviklingen av mørke flekker, holdt vi fisk ved lavt oksygeninnivå ved å ha fisken gående i et kar uten tilførsel av sjøvann. Laksen ble holdt i karet til oksygeninnivået kom ned på 5 mg/l. Da ble fisken hovet over i merd med annen fisk der den gikk i to måneder før den ble slaktet. All fisken i merden var i utgangspunktet PIT-tag merket (nullåring fra fôringsstudien). Registreringene av filet viste at lavt oksygeninnivå førte til fordobling av mørke flekker i filet ved slakt.

Lavt oksygeninnivå i vannet fordoblet forekomsten av mørke flekker

12.3 Klem og slagskader

Simulerte klemskader ved sortering av smolt og laks i sjø samt slagskader økte forekomsten av blødninger i indre muskulatur. Videre observerte vi blødninger i området der laksen har høyest omkrets og som sammenfaller med området med hyppig forekomst av mørke flekker (Figur 58). Undersøkelsene ble blant annet utført ved bruk av en minimodell/ prototype for sortering som ble utviklet i samråd med produsent av sorteringsutstyr og med rådgivning av Luleå Universitet (ingeniørlinjen). Med noen justeringer kan utstyret fungere som testmodell for sortering av fisk i ulike størrelser i sjø (Figur 60).

Studiene indikerer at klemskader kan gi langvarige skader i form av økt melanindeponering i fileten. Vi vet imidlertid ikke hvor lang tid det tar før blødningene utvikler seg til mørke flekker (observert mørkpigmentering etter 6 og 12 måneder i forsøkene). Det er usikkert om klemskader i ferskvannsfasen kan føre til økt forekomst av mørke flekker i slaktefisk.



Figur 58 Laks i ferskvann ble utsatt for simulert hard sortering etter bedøving og før avliving. Som det fremgår av bildet fikk laksen en avgrenset blødning i fileten der fisken er tykkest.



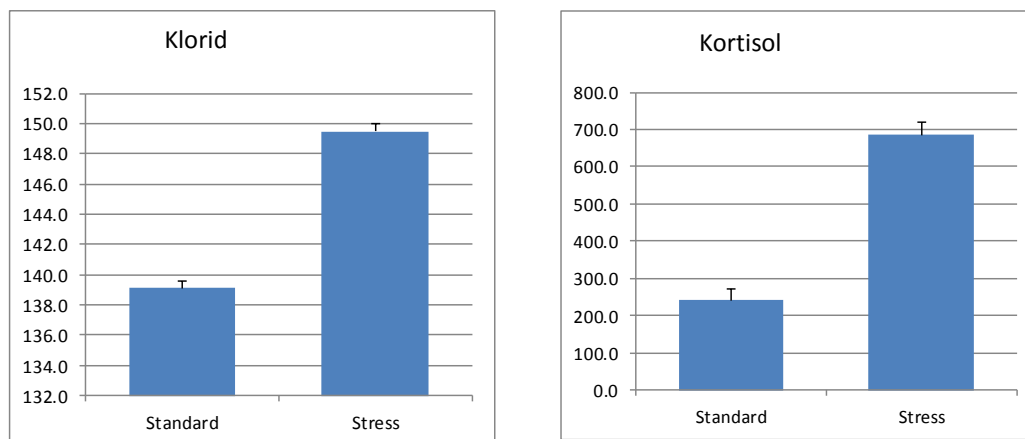
- Model for å teste evt skadeeffekter av sortering
- Bygget i samråd med produsent

Figur 59 Model for å teste eventuelle skadeeffekter av sortering av laks. Modellen kan justeres i forhold til fiskestørrelse.

Klemskader ser ut til å øke forekomsten av mørke flekker

12.4 Trenging i forbindelse med slakt

Effekt av trenging og kraftige muskelsammentrekninger ble undersøkt (trenging i hov). Laksen ble undersøkt umiddelbart etter trenging og etter én måned. Effekten av stress ble dokumentert ved blodanalyser og viser signifikant ($P < 0.05$) økning av generelle stressparametere (Figur 60). Resultatene viste ingen effekt av korttidsstress på forekomst av mørke flekker.



Figur 60 Plasma nivå av klorid og kortisol. Resultatene er vist for laks som ble slaktet skånsomt (Standard) eller etter trenging i hov (Stress).

Ingen effekt av trenging før slakt

12.5 Konklusjon og oppfølging

- Ingen effekt av tetthet i merd to måneder før slakt
- Lavt oksygennivå i vannet fordoblet forekomsten av mørkpigmentert muskel
- Klemskader og slagskader ser ut til å øke forekomsten
- Trenging i forbindelse med slakt hadde ikke betydning for utvikling av mørke flekker

I videre studier bør laks følges opp regelmessig etter kontrollert trykkpåføring for å få mer kunnskap om tidsaspektet for utvikling av mørke flekker og helingsprosesser samt laksens sensitivitet for handling i ulike livsfaser.

Effekt av vannkvalitet slik som lavt oksygennivå bør dokumenteres mer grundig og for ulike livsfaser.

13 Presentasjoner og skriftlig materiale fra prosjektet

Faktaark, FAQ. Fhf.no

Artikkel Norsk Fiskeoppdrett

Mørkøre, T., Larsson, T., Koppang, E-O., Krasnov, A., Moreno, H., Prytz, K., 2015 Mørke flekker i laksefilet: Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget. Norsk Fiskeoppdrett 8, 140-145

Mastergradsoppgave

Marina P J. 2014. Effects of vaccination and dietary treatment on development and melanin deposition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Mastergradsoppgave, Norges miljø og biovitenskapelige universitet, Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskaper.

Foredrag

Mørkøre, T., 2015. Can farming conditions affect the occurrence of "black spots" in salmon fillets? Elanco Fiskehelseseminar AquaNor 19. august 2015 Thon Britannia Hotel, Trondheim.

Mørkøre, T., 2015. Nytt om melanin i laksefilet. Skretting AquaTraining, Gran Canaria Mars 2015.

Mørkøre, T. 2015. Flesh quality of farmed Atlantic salmon: The importance of breeding and genetics, diet and health management. Site visit Japan-Norway joint committee meeting (Japanske og Norges forskningsråd samt departementene). Norwegian University of Life Sciences (NMBU) and Nofima 12.02.2015.

Mørkøre, T. 2014. Hva vet vi om årsaker til melanin i laksefilet. Produktivitetskonferansen, Kristiansund. Kontali.

Koppang, E-O., 2014. Melanin. Europharmas Lofotseminar.

Mørkøre, T., 2014 FoU- hva krever det? Hva skal til for å få felles deltakelse og et godt samarbeid bedrift – forsker? Kurs i FoU og virkemiddelbruk (FHF og Innovasjon Norge), Skagen hotell, Bodø.

Mørkøre, T., 2014. Mørke flekker i laksefilet årsaker og forebyggende tiltak. Årssamling, Nordnorsk Havbrukslag, Tromsø 9.-10. januar 2014.

Mørkøre, T., 2013. Dark spots in salmon fillets - statistics and status on causalities. WorkShop, MareLife, Norwegian School of Veterinary Science.

Mørkøre, T., 2013. Sammenheng mellom filetkvalitet og fiskehelse. FHF samling: Økt overlevelse i sjøfasen. Flesland Bergen. August 27-28.

Mørkøre, T., 2013. Relationship between fish health and fillet quality in Atlantic salmon. International PhD course, Marie Curie Program: Diseases in salmonid aquaculture-Challenges and management. 22-24 May. Hotel Lyseby, Oslo.

Larsson, T., Mørkøre, T. Melanin i laksefilet: Nytt prosjekt, ny kunnskap og oppdatert statistikk. FHF Havbruk, Rica Hell Hotell, 12-13. Juni.

Mørkøre, T., 2013. Filetkvalitet laks. Lofotprodukter 17. april, Leknes. Mørkøre, T., 2012. Kvalitet av sjømat. Fagdag Ås, Mattilsynet 10. oktober 2012.

Mørkøre, T., 2012. Kartlegging av melanin. Park Inn hotell, Gardermoen.

Mørkøre, T., 2012. Ny kunnskap om faktorer som påvirker kvalitet. National Centre of Expertise 7.-8. November Bodø.

Mørkøre, T., 2012. Fôrets betydning for laksens helsetilstand, kvalitet og næringsverdi som mat for mennesker. FHF verdikjede laks. 14.-15. mai 2012. Gardermoen

Prosjektresultater har også vært presentert hos privatbedrifter

Arbeidsmøter

Workshop November 2013

DARK SPOTS IN SALMON FILLETS

November 16th 2013

Clarion Hotel, Oslo Airport Gardermoen

Foredragene:

- Welcome. *Erling Olaf Koppang, Norwegian School of Veterinary Science*
- Extracutaneous pigmentary system, *Ronald Roberts, Editor of Journal of Fish Diseases*
- Melanin production in salmon/Melanindannelse i oppdrettslaks, *Erling Olaf Koppang, Norwegian School of Veterinary Science*
- Histologic manifestations of melanized salmon tissue/Histologiske manifestasjoner av melanisert vev, *Agnar Kvellestad: Norwegian School of Veterinary Science*
- Quantitative genetics of vaccine-induced side effects in salmon/Grad av bivirkninger ved vaksinerer er arvelig betinget, *Bjarne Gjerde, Nofima*
- Dark spots in salmon fillets - statistics and status on causalities/Melaninflekker i laksefilet - Statistikk og status på årsakssammenhenger, *Turid Mørkøre, Nofima*
- Relationship between melanin deposition in various tissues: organs, peritoneum, fillet/Melanisering av organer, bukhinne og filet – hva er sammenhengen, *Thomas Larsson og Jens-Erik Dessen, Nofima*

Workshop oktober 2014

DARK SPOTS IN SALMON FILLETS

October 16th 2014

Clarion Hotel, Oslo Airport Gardermoen

Foredragene:

- Welcome, *Turid Mørkøre, Nofima*
- Results and overview of R&D activities on dark fillet spots at Marine Harvest, *Øyvind Oaland, DVM. Director Global R&D and Technical. Marine Harvest ASA*
- Research activities on dark spots in salmon fillets, *Svein Alexandersen Sales Manager Norway. PHARMAQ AS*
- Research activities on dark spots in salmon fillets, *Niels Petter Måseide, Customer manager MSD Animal Health*
- Some case studies of fillet quality issues in Scotland, *Marian McLoughlin MVB PhD MRCVS. Fish Vet Group*
- Evolution of dark spots in salmon fillets and histological characterization, *Erling Olaf Koppang Professor/Agnar S. Kvellestad University lecturer BASAM, Norwegian University of Life Sciences*
- Connective tissue characterisation of dark stained spots in salmon fillets, *Helena M. Moreno Conde, senior scientist Departamento de Productos. Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)*
- Updated statistics on the occurrence of dark spots and new insights from gene expression analyses,
Thomas Larsson researcher and Aleksei Krasnov, senior scientist Nofima
- Current knowledge and future direction of research on dark stained spots in salmon fillets, *Discussion/summing up*

Workshop

DARK SPOTS IN SALMON FILLETS

November 5th 2013, 09:30 – 14:30

BEST WESTERN Oslo Airport Hotel, Gardermoen

www.planvikingarvett.no (organisations related details are arranged)

SCHEDULED LECTURES

Wellcome, Orlaf Gjelten, Norwegian School of Veterinary Science

Retrospective pigmentary system

Reinhold Krenn, *Journal of Fish Diseases*

He is among the world's most cited experts within the field of fish pathology

Metabolic production of melanin / Melanin metabolism / pigmentation

Orlaf Gjelten, Norwegian School of Veterinary Science

Discussion from years of research, including the new PhD "Studies of melanin metabolism and pigmentation

Dark spots - in Atlantic salmon" by H.A.S. Paparodis

Histologic manifestations of melanized cells in tissues / Histologic manifestations of melanized cells

Orlaf Gjelten, Norwegian School of Veterinary Science

Including latest new results from our melanin project / Induktion av melanin i laksefilet

metaninprosjekt

Quantitative genetics of melanin induced side effects in salmon / Quantitative genetics and side effects in salmon

Orlaf Gjelten, Nofima

Selective breeding for long-term reduction of melanin deposition in salmon fillets / Kan avl bidra til å redusere

problemet med melanin i laksefilet

Dark spots in salmon fillets - analysis and control measures / Melanin i laksefilet - Analyse og kontroll

Torstein Skjerve, Nofima

Statistical analysis of pigmentation of post-smolt plants / Statistisk analyse av melanin i laksefilet

Relationship between melanin deposition in various tissues organs, post-smolt, fillet / Melanin i laksefilet

Orlaf Gjelten, Norwegian School of Veterinary Science

To include in the discussion, Recognition, "Dark spots" in salmon fillets

* Farming industry / Oppdrettsindustri

* Veterinary producers / Veterinærproduksjon

* Institutional research



Workshop

DARK SPOTS IN SALMON FILLETS

October 15th 2014, 09:30 – 14:30

Clarion Hotel, Oslo Airport Gardermoen

SCHEDULED PRESENTATIONS FROM INDUSTRY AND FISH HEALTH SERVICES

State of the art regarding dark spots in salmon fillets.

Results and overview of MSD activities

- [Merise / Merise](#)
- [Pharmag](#)
- [MSD Animal Health](#)
- [Fish Vet Group](#)

SCHEDULED PRESENTATIONS FROM THE PROJECT

"Dark spots in salmon fillets, causes and potential measures"

- [Norwegian Veterinary University / NMBU](#)
- [Institute of food science, technology and nutrition \(ICTAN / CSK\)](#)
- [Nofima](#)

Attendance is free

Lunch will be served



14 Referanser

- Bjørngen, H., Wessel, Ø, Fjellidal, P.G., Hansen, T., Sveier, H., Sæbo, H.R., Enger, K.B., Monsen, E., Kvellestad, A., Rimstad, E., Koppang, E.O. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Veterinary Research* 49.
- Cooper, M., Midling, K.O. (2007). Blood vessel melanosis: a physiological detoxification mechanism in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquacult. Int.* 16: 43-54.
- Drangsholt, T., Gjerde, B., Ødegard, J., Fridell, F., Bentsen, H.B. (2011). Quantitative genetics of vaccine-induced side effects in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 318, 316-324.
- Edsall, C.C. (1999). A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of aquatic animal health*, **11**, pp. 81–86.
- Einen, O., Mørkøre, T., Rørå, A.M.B., Thomassen, M.S., 1999. Feed ration prior to slaughter - a potential tool for managing product quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 178, 149-169.
- Finstad, Ø. W., Dahle, D.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**, Article Number 35.
- Fiskehelserapporten 2014. Bornø G & Lie Linaker M (red), Harstad: Veterinærinstituttet 2015.
- Helland, S.J., GrisdaleHelland, B., Nerland, S (1996) A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture* 129, 157-163.
- Heydarnejad, M.S., Khosravian-Hemami, M., Nematollahi, A., Rahnama, S. (2013). Effects of copper at sublethal concentrations on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International review of hydrobiology*, **98**, pp. 71–79.
- http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3104.pdf
- Lerfall, J., Larsson, T., Birkeland, S., Taksdal, T., Dalgaard, P., Afanasyev, S., Bjerke, M.T., Mørkøre, T., (2012). Effect of pancreas disease (PD) on quality attributes of raw and smoked fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 324, 209-217.
- Mommsen, T.P. (2004). Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comparative biochemistry and physiology b-biochemistry & molecular biology*, **139**, pp. 383–400.
- Mørkøre, T. (2012). Filet av oppdrettslaks: Kvalitetsavvik og årsakssammenhenger. FHF-prosjekt 900339. Rapport 17/2012, Nofima, Ås.
- Rodger H.D., Murphy, T.M., Drinan, E.M., Rice, D.A. (1991). Acute skeletal myopathy in farmed Atlantic salmon *Salmo-salar*. *Diseases of aquatic organisms*, **12** pp. 17–23.
- Yousaf, M.N. & Powell, D.A. (2012). The Effects of Heart and Skeletal Muscle Inflammation and Cardiomyopathy Syndrome on Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Levels in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific World Journal*, Article Number 741302.

