

## Risikoanalyse- utfordringer knyttet til nyreforkalkninger

### Oppdrag

I forbindelse med etableringen av et nytt akvakulturanlegg i Smedvågen er det ønskelig med en risikovurdering knyttet til nyreforkalkninger. Anlegget skal baseres på resirkulering og blant annet produsere fisk helt frem til slaktestørrelse. Det er rapportert om et økende innslag av nyreforkalkninger hos fiskegrupper produsert i RAS-anlegg sammenlignet med tradisjonelle gjennomstrømningsanlegg. Dette stiller større krav til at det ikke forekommer faser i produksjonen med driftsbetingelser som utløser forkalkninger i nyrene. Utfordringer knyttet til forkalkninger vil kunne påvirke tilveksten til fisken i fasen etter at fisken er satt over på sjøvann og slik forringe produksjonsresultatet og velferden til fisken.

### Risikomatrixe MarinHelse AS

5	10	15	20	25	>12	Kritisk
4	8	12	16	20	6-12	Betydelig
3	6	9	12	15	<6	Ubetydelig
2	4	6	8	10		
1	2	3	4	5		

### Sannsynlighetsmodell

Nivå	Sannsynlighet
1	>10 år
2	5-10 år
3	2-5 år
4	0,5-2 år
5	< 0,5 år

### Konsekvensmodell

	Nivå	Beskrivelse
1	Ubetydelig	Ubetydelige skader eller belastninger på mennesker, fisk og/eller materielle verdier
2	Mindre alvorlig	Små skader eller belastninger på mennesker, fisk og/eller materielle verdier

3	Alvorlig	Alvorlige skader og belastninger på mennesker, fisk og/eller materielle verdier
4	Kritisk	Kritiske skader på mennesker, fisk og/eller materielle verdier
5	Katastrofal	Katastrofal skade eller belastning på mennesker, fisk og/eller materielle verdier

### Aktuell vurdering:

#### Forutsetninger:

Det foreligger en fysiologisk status hos fisken som i et samspill med vannkvalitet og endringer i vannkvaliteten kan bidra til en etablering av kalk i nyrene til fisken.

Risikofaktorer	Ønsket beskyttelsesnivå	Sannsynlighet	Konsekvens	Risiko	Risikohåndtering
Se under eget punkt «Vurdering av risikofaktorer» For omfattende til å plassere i en tabell		> 10 år (1)	Kritisk (4)	4	

## Vurderinger under produksjon Averøy Industripark knyttet til nyreforkalkninger

Averøy Industripark er et resirkuleringsanlegg (RAS-anlegg) som tar inn både ferskvann og sjøvann til sin produksjon og hvor man skal produsere fisken frem i lukkede resirkuleringsssystemer frem til fisken når slaktevekt. Under slike driftsforutsetninger må man påregne en risiko for at det kan oppstå driftsperioder hvor fisken kan utvikle forkalkninger i nyrene. Grunnlaget for risikovurderingen baserer seg på oppdatert forskning på nyreforkalkninger i akvakulturanlegg samt erfaringer fra felt. Vi vil se på bakgrunnsstoff og sykdomstegn, samt risikofaktorer og håndtering av lidelsen.

### Bakgrunnsdata Nyreforkalkninger

Nefrokalsinose er en "gammel" problemstilling, og ble første gang beskrevet hos laks (*Salmo salar*) i 1999 (Fivelstad et al., 1999). Veterinærinstituttet beskrev tilstanden første gang i sin fiskehelse rapport fra 2006 (Olsen et al., 2006), og tilstanden er nevnt i alle utgitte rapporter siden. Vi vet altså i dag ikke omfanget av utbredelsen av nefrokalsinose, men basert på tilbakemeldinger fra næringen og fiskehelsepersonell kan det se ut til at omfanget har økt, til tross for mangel av systematisk registrering. Tilstanden rapporteres ofte som et tilleggfunn ved sykdommen hemorragisk smoltsyndrom (HSS) (Hjeltnes et al., 2019), og det har derfor blitt stilt spørsmålstegn ved om tilstandene er knyttet sammen.

Nefrokalsinose er beskrevet som utfelling av kalsium- og magnesiumsalter i urinlederen og/eller samlør hos fisk (Bruno, 1996). Dødelighet fra tilstanden er generelt lav i oppdrett, siden den ansees som reversibel (Schlotfeldt, 1981; Fivelstad et al., 1999; 2002). Tilstanden byr likevel på velferdsutfordringer for laksen, og det er sannsynlig at nedsatt nyrefunksjon svekker laksen og gjør

den mer utsatt for sykdom og stress. HSS derimot induserer dramatiske fysiologiske endringer, og kjennetegnes ved anemi og omfattende blødninger i de fleste organer (Rodger & Richards, 1998; Nylund et al., 2003). I likhet med nefrokalsinose har HSS gitt liten dødelighet i anleggene og det er kanskje derfor det finnes svært lite vitenskapelig litteratur om sykdommen (Woo et al., 2014). Det er gjort få undersøkelser av hva forkalkningene består av. Så vidt vi vet finnes det ikke publiserte studier hos laks, men i en undersøkelse utført av MarinHelse AS på postsmolt (Salmo Salar) i 2017/2018, bestod forkalkningene av amorf dahlitt ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ ), med mulig spor av whitlockitt ( $\text{MgCa}_2\text{PO}_4$ ). (Sæther, TEKSET 2019). Samme selskap gjennomførte en ytterligere sammenligning mellom forkalkninger i nyrer fra 5 RAS-anlegg i 2019 hvor forkalkninger ble analysert ved AHUS via fouriertransform infrarødspektroskopi. Utvalget bestod både av anlegg med og uten RAS-teknologi og det var overveiende amorf dahlitt som ble funnet i alle fem anlegg uavhengig av driftsmetode og vannkvalitet. Amorf dahlitt består hovedsakelig av kalsiumfosfat. 80 % av alle nyresteiner hos mennesker består av kalsium og forårsakes av et kalsiumoverskudd i kroppen.

Blant andre marine arter er det gjort en studie på Cobia, (*Rachycentron canadum*), en abborfisk, der nyresteinene bestod av rent kalsium, oksalat og kalsiumfosfat (Klosterhoff et al., 2015). Nefrokalsinose hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), som er en art som historisk sett har hatt større utfordringer knyttet til forkalkninger i nyrene, har blitt undersøkt i flere studier. Gillespie & Evans (1979) og Bjerknes et al. (1994) konkluderte at de bestod av kalsium, fosfor, karbonat og magnesium, mens Fikri et al. (2000) fant at de inneholdt ammoniumurat ( $\text{NH}_4\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3$ ) og kalsiumfosfat.

Det er mye som tyder på at nefrokalsinose er miljøbettinget. Det har blitt foreslått flere mulige årsaker, bla. eksponering for høye  $\text{CO}_2$ -verdier (Smart et al., 1979; Fivelstad et al., 1999; 2003; 2013; 2015b; 2018; Hosfeld et al., 2008; Good et al., 2010; 2018; Khan et al., 2018; Mota, 2019). Kombinasjonen av høy fisketetthet, et høyt nivå av karbondioksyd, lave oksygennivåer og lav pH er kjent for å kunne føre til en metabolsk acidose hos fisken som igjen kan føre til kalsiumutfellinger i urinen. Bruk av kalsiumkarbonat for å justere alkalitet og pH i RAS-anlegg (Chen et al., 2001), magnesium-mangel (Knox et al., 1981), selentoksisitet (Bruno, 1996; Hicks et al., 1984), eller høy tetthet og lav flow (Damsgård et al., 2011) er også ansett som mulige årsaker til lidelsen. Det er også mulig at høye nivåer av fosfat spiller en rolle (Lewis et al., 2013). Andre foreslåtte årsaker, som ikke er vitenskapelig testet er hardhet, brått skifte i vannkjemi med stor tilgang på magnesium og kalsiumioner (Bjerknes et al., 1994), smoltifisering status og endringer i ernæring. Så vidt vi vet har ingen studie undersøkt betydningen av fôr i utviklingen av nefrokalsinose i laks. I motsetning har flere artikler rapportert at ernæring er den viktigste faktoren i utvikling av nyrestein hos pattedyr, som hund og katt (Tion et al., 2015). Ubalanse i konsentrasjoner i vitamin D, kalsium, fosfor eller syrer i kosthold kan forårsake utvikling av nyrestein (Shavit et al., 2015; Phillips et al., 1986; Gambaro & Trincheri, 2016) og nyrestein kan derfor ofte behandles med fôrtilpasninger i pattedyr (Davies, 2016). Hos regnbueørret er det rapportert at fôr med høyt innhold av fosfor og kalsium og/eller lav magnesiumkonsentrasjon kan føre til forekomst av nefrokalsinose (Heinen et al., 1993; 4 Knox et al., 1981). I fisk, og spesielt fisk i en aktiv vekstfase, er det behov for disse komponentene, som tilsettes i betydelige mengder i fôr. Variasjoner av fôr innhold mellom forskjellige produsenter og batcher har ikke vært dokumentert hos laks i settefiskanlegg.

Genetisk predisposisjon for og hvilke mekanismer som fører til nefrokalsinose har ikke vært dokumentert hos laks. Hos pattedyr derimot ser man ofte en genetisk faktor ved utvikling av

nyrestein som antyder en metabolsk defekt (Lulich et al., 1999; Sayer et al., 2004; Vezzoli et al., 2011).

### Symptomer hos fisk

Fisk som blir rammet av nyreforkalkninger får utfellinger av kalklignende materiale i nyretubuli og utførselsganger. Disse utfellingene beskrives som tre ulike former ut fra konsistensen på materialet (seigt, kornete, hardt). Diagnosen stilles ofte gjennom obduksjon og forandringene sees som regel med det blotte øye. Man kan dele inn alvorlighetsgraden av forkalkningene. MarinHelse AS og Pharmaq Analytic utarbeidet en scoringsveileder for nyreforkalkninger som har vist seg å være relativt dekkende og samsvarende mellom makroskopiske funn og histologiske funn.

Grad 0: ingen tegn til forkalkninger

Grad 1: Overtydlig urinledere med lette forkalkninger på innsiden av tubuli

Grad 2: Forkalkninger i urinlederne med lette forgreninger til sidene

Grad 3: Tykke forkalkninger i urinlederne med tydelige forgreninger til sidene

Grad 4: Tykke forkalkninger i store deler av nyret og brudd på basalmembran og hevelser i nyret klassiske tegn til en akutt nyrebetennelse

Grad 5: Svullent nyre med tydelig akutt betennelse uten synlige tegn til forkalkninger

**Grad 0**  
Ingen tegn til forkalkninger



**Grad 1**  
Overtydlig urinledere med lette forkalkninger på innsiden av tubuli



**Grad 2**  
Forkalkninger i urinlederne og lette forgreninger til sidene



**Grad 3**  
Fulle urinledere og tydelige forgreninger av forkalkningene til



**Grad 4**  
Med betydelige forkalkninger og hevelse av nyret



**Grad 5**  
Uten forkalkninger, men med betennelse og hevelse i nyret



## Vurdering av den aktuelle risikofaktor

### Diskuterte risikofaktorer

Vi har i denne risikovurderingen valgt å fokusere på følgende hovedområder;

#### Vannkvalitet

- Høye co2-nivåer
- Hurtige endringer av co2-nivå
- Fritt co2, bundet co2
- Lave o2-nivåer
- Ph, hurtige endringer i pH
- Høy tetthet av fisk
- Høy alkalitet
- Stort innhold av calcium i driftsvann (Hardhet)
- Høy hardhet, alkalinitet og mye fritt/bundet Co2
- Høy hardhet, alkalinitet og mye fritt/bundet Co2 og osmoregulerisk dysfunksjon hvor nyret spiller en viktig rolle (sjøvannstilpasset fisk i feil vannmiljø)

#### Ernæring

- Stor tilgang på phosphor
- Lavt nivå av magnesium
- Toksiske nivåer av Selen og Arsen
- Helsefôr med høyt nivå av antioksydanter

Indre biologiske rytmer som forstyrres og påvirker nyrenes funksjon negativt

- Osmoregulering
  - Sjøvannstilpasning/smoltifisering
  - Sees ofte sammen med HSS
  - Bløtvevsforkalkninger

### Risikoreducerende tiltak

Det foreligger per i dag svært lite kunnskap til hva som ligger bak en utfelling av kalsiumfosfat i nyrene på laksefisk. Problemet er økende og det sees oftere i RAS-anlegg enn i gjennomstrømningsanlegg. Høye karbondiosydnivåer har vist seg å gi forkalkninger i flere studier, men nyere studier igjen viser at det må være andre sammenfallende forhold for å utløse forkalkningene. Co2 alene har ikke nødvendigvis en slik effekt (Mota et al 2019). Basert på de siste års erfaringer med RAS-teknologi og nefrokalsinose, så ser det ut til at fiskegrupper som ikke smoltifiseres på vanlig måte er overrepresentert iblant problemanleggene. Flere forskere har sett en mulig sammenheng mellom HSS og nefrokalsinose og da kan det være nærliggende å tro at deler av samme årsaksforhold ligger bak begge lidelsene.

Det er MarinHelse sin oppfatning at det vil være fornuftig å basere tiltakene rundt nyreforkalkninger på stabil og god vannkvalitet med lave co2-nivåer samt understøttelse av fiskens smoltifisering gjennom fornuftig bruk av positive og negative smoltifiseringssignaler ut gjennom produksjonen. Regelmessig overvåking av nyrestatus gjennom de forskjellige produksjonstrinnene vil være av betydning for å kunne gå inn tidlig med korrigerende tiltak.

Forslag til risikominimerende produksjonsrutiner under drift

- Sørg for å holde oksygenivåene rundt 100 % metning
- CO2-konsentrasjonen i kar skal ligge under 15 mg/l
- pH bør ligge rundt 7,4 ved normal drift
- Det skal unngås bruk av kalsiumholdige buffertilsetninger og heller benyttes lut og karbonat for buffring av driftsvannet
- Sjøvann tilsettes etter driftsplan
  - Skaper en buffer mot H2S hvis oksygenet skulle droppe i biofilm eller
- Holde alkaliniteten mellom 100-200 mg/l

## Konklusjon

Med bakgrunn i de overnevnte faktorene er det en risiko for nyreforkalkninger hos Averøy Industripark AS. Akvakulturanlegget er basert på RAS-teknologi, noe som betyr at det resirkulerer mye vann og holder forholdsvis høye temperaturer gjennom hele året. Forbruket av oksygen blir høyt og dette åpner for en høy co2-produksjon i driftsvannet av både fisk og bakterier. I tillegg er det en stram produksjon med muligheter for tilføring av større mengder kalsium og utfordringer knyttet til tidlig sjøvannstilpasning.

Det er MarinHelse AS sin oppfatning at utfordringene knyttet til nyreforkalkninger kan overvåkes, håndteres og kontrolleres via et godt fokus på de risikominimerende tiltakene som er listet opp i denne risikovurderingen. I forbindelse med etableringen av Averøya Industripark AS har man hatt muligheten til å treffe preventive tiltak på både vannkvalitet og smoltifiseringsrutiner. Dette er av stor fordel.

Summen av de foreslåtte tiltakene i risikovurderingen burde være tilstrekkelige til å redusere risikoen for nyreforkalkninger til et akseptabelt nivå. I tillegg burde det være gode muligheter til å stoppe anløp av utbrudd gjennom den foreslåtte overvåking.

Per Anton Sæther  
Veterinær  
MarinHelse AS

## Referanser

- Bjerknes V., Lydersen E., Golmen L G., Hobæ, A. & Holtet L. (1994) Nefrokalsinose hos regnbueørret i oppdrettsanlegg ved Trengereid. Miljømessige årsaker. NIVA-rapport O-93249.
- Bruno D.W. (1996) Nephrocalcinosis. Aquaculture Information Series. Marine Laboratory, Aberdeen, 16, 1-5.
- Chen C.Y., Wooster G.A., Getchell R.G., Bowser P.R. & Timmons M.B. (2001) Nephrocalcinosis in Nile Tilapia from a Recirculation Aquaculture System: A Case Report. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 368-372.
- Damsgård B., Bjørklund F., Johnsen H.K. & Toften H. (2011) Short- and long-term effects of fish density and specific water flow on the welfare of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 322-323, 184-190.
- Fikri A., Recai T., Hijran Y.Y. & Oguz K. (2000) Nephrocalcinosis in intensively reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 52, 111-117.
- Fivelstad S. (2013) Long-term carbon dioxide experiments with salmonids. Review. *Aquaculture engineering* 53, 40-48.
- Fivelstad S., Hosfeld C., Handeland S., Terjesen B.F. & Kvamme K. (2015b) Sluttrapport for Postsmolt D: Grenseverdier for karbondioksid for postsmolt. Høgskolen i Bergen. FHF-prosjekt 900895, 34 pp.
- Fivelstad S., Hosfeld C.D., Medhus R.A., Olsen A. & Kvamme K. (2018) Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures. *Aquaculture* 482, 83-89.
- Fivelstad S., Kvamme K., Handeland S., Fivelstad M., Olsen A.B. & Hosfeld C.D. (2015a) Growth and physiological models for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr exposed to elevated carbon dioxide concentrations at high temperature. *Aquaculture* 436, 90-94.
- Fivelstad S., Olsen A.B., Asgard T., Bæverfjord G., Rasmussen T., Vindheim T. & Stefansson S. (2002) Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture* 215, 301-319.
- Fivelstad S., Olsen A.B., Kløften H., Ski H. & Stefansson S. (1999) Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture* 178, 171-187. 10
- Fivelstad S., Waagbø R., Zeitz S.F., Hosfeld A.C.D., Olsen A.B. & Stefansson S. (2003) A major water quality problem in smolt farms: combined effects of carbon dioxide, reduced pH and aluminium on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts: physiology and growth. *Aquaculture* 215, 339-357.
- Gambaro G. & Trinchieri A. (2016) Recent advances in managing and understanding nephrolithiasis/nephrocalcinosis. *F1000 Research* 695, 1-8.
- Good C., Davidson J., Terjesen B.F., Takle H., Kolarevic J. & Bæverfjord G. (2018) The effects of long-term 20 mg/L carbon dioxide exposure on the health and performance of Atlantic salmon *Salmo salar* post-smolt in water recirculation aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 81, 1-9.
- Good C., Davidson J., Welsh C., Snekvik K. & Summerfelt S. (2010) The effects of carbon dioxide on performance and histopathology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in water recirculation aquaculture systems. *Aquaculture Engineering* 42, 51-56.
- Hicks B.D., Hilton J.W. & Ferguson H.W. (1984) Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 7, 379-389.
- Hjeltnes B., Bang Jensen B., Bornø G., Haukaas A., Walde C.S. (red), Fiskehelse rapporten 2018, utgitt av Veterinærinstituttet 2019, 132pp.
- Hosfeld C.D., Engevik A., Mollan T., Lunde T.M., Waagbø R., Olsen A.B., Breck O., Stefansson S. & Fivelstad S. (2008) Long-term separate and combined effects of environmental hypercapnia and hyperoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture* 280, 146-153.
- Khan J.R., Johansen D. & Skov P.V. (2018) The effects of acute and long-term exposure to CO<sub>2</sub> on the respiratory physiology and production performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater. *Aquaculture* 491, 20- 27.

- Mota V.C., Nilsen T.O., Gerwins J., Gallo M., Ytteborg E., Baeverfjord G., Kolarevic J., Summerfelt S.T. & Terjesen B.F. (2019) The effects of carbon dioxide on growth performance, welfare, and health of Atlantic salmon postsmolt (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 498, 578-586.
- Nylund A., Plarre H., Hodneland K., Devold M., Aspehaug V., Aarseth M., Koren C. & Watanabe K. (2003) Haemorrhagic smolt syndrome (HSS) in Norway: pathology and associated virus-like particles. *Diseases of Aquatic Organisms* 54:15-27.
- Olsen A.B., Bornø G., Colquhoun D., Flesjå K., Haldorsen R., Mo T.A., Nilsen H., Skjelstad H.R. & Hjeltnes B. (2006) Helsestatusjonen hos oppdrettsfisk 2006. Veterinærinstituttet, 20pp.
- Rodger H.D. & Richards R.H. (1998) Haemorrhagic smolt syndrome: a severe anaemic condition in farmed salmon in Scotland. *Veterinary Record* 142, 538-541.
- Sayer J.A., Carr G. & Simmons N.L. (2004) Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clinical Science* 106, 549-561.
- Schlotfeldt H.J. (1981) Some clinical findings of a several years survey of intensive aquaculture systems in northern Germany, with special emphasis on gill pathology and nephrocalcinosis. In: Tiews K. (Ed.), *Proc. World Symp. on Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems* vol. I, pp. 109– 119. Berlin. 11
- Shavit L., Jaeger P. & Unwin R.J. (2015) What is nephrocalcinosis? *Kidney International* 88, 35-43.
- Smart G.R., Knox D., Harrison J.G. , Ralph J.A., Richards R.H. & Cowey C.B. (1979) Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Fish Diseases* 2, 279-289.
- Sæther P.A. (2019) MarinHelse - fisken i fokus. Presentasjon på TEKSET 2019, Clarion Hotel og Congress Trondheim, Norge.