

Rapport
Oppdrag 1715

VESO Oslo Veterinary science opportunities



Resistens hos bendelorm (*Eubothrium* sp.)

Sluttrapport 2008

VESO Oslo

Veterinary science opportunities

Tittel: Resistens hos bendelorm (<i>Eubothrium</i> sp.)	
Forfatter: Dr. Sigmund Sevatdal	
Utarbeidet av: VESOs hovedkontor, Oslo	Oppdragsgiver: FHF
Prosjektnummer: 1715	Oppdragsgivers referanse: Prosjekt 552024
Prosjektleder: Sigmund Sevatdal	Kontaktperson: Kjell Maroni

Formatert: Norsk (bokmål)

Dato: 20.desember 2008	Tilgjengelighet/ISBN: Konfidensiell
Antall sider: 5	Antall vedlegg:
Stikkord: Bendelorm, <i>Eubothrium</i> sp., resistens, alternativ behandling	
Engelsk sammendrag: The effect of the alternative treatments albendazol, morantel, oxfendazol, clorsulon, oxibendazol, thiabendazol and triclabendazol were compared to the effect of praziquantel and fenbendazol on tapeworm (<i>Eubothrium</i> sp.) in Atlantic salmon. Oxibendazol has effect, but gives the same type of adverse effect as fenbendazol; reduced appetite during and after treatment. A bioassay for measuring sensibility to praziquantel is developed and standardized. This bioassay should be verified against resistant tapeworm populations when possible	
Norsk sammendrag: I dette prosjektet ble effekten av de alternative behandlingsmidlene albendazol, morantel, oxfendazol, clorsulon, oxibendazol, thiabendazol og triclabendazol sammenlignet med effekten av praziquantel og fenbendazol på bendelorm (<i>Eubothrium</i> sp.) i atlantisk laks. Oxibendazol har effekt, men har samme type bieffekt som fenbendazol; nedsatt appetitt under og etter behandling. Et bioassay for måling av følsomhet for praziquantel er utviklet og standardisert. Bioassayet bør evalueres med resistente bendelorm populasjoner når dette er mulig.	
VESO, Ullevålsvn 68, postboks 300 Sentrum, 0103 Oslo, Tlf. 2296 1100, Fax 2296 1101	

Resistens hos bendelorm (Eubothrium sp).

Sluttrapport 2009

Sponsorer: Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF)
Postboks 429, Sentrum, 0103 Oslo
Fagsjef FOU *Kjell Maroni*

Skretting AS
Sjøhagen 15, 4016 Stavanger
Produksjef *Margunn Sandstad*

Marine Harvest Norway AS
Sandviksbodene 78 A, 5035 Bergen
Forskningsjef Dr. *Olav Breck*

Norges Veterinærhøyskole (NVH)
Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi
Seksjon for farmakologi og toksikologi.
Postboks 8146 Dep. 0033 Oslo
Kontaktpersoner: Professor Dr. *Tor Einar Horsberg*

Intervet Schering-Plough
Thormøhlensgt. 55, 5008 Bergen
Veterinær *Lene Høgseth*

Studien er gjennomført av:

VESO AS
Postboks 300 Sentrum
0103 Oslo
Forsker Dr. *Sigmund Sevatdal*

Marine Harvest, Hjelmeland
4130 Hjelmeland
Veterinær *Anna Lena Kleppa*

Centre for Aquaculture Competence (CAC) Langavika
4130 Hjelmeland
Avd. leder *Trine Danielsen*

Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag.....	5
2. Bakgrunn.....	5
3. Innledning.....	5
4. Hovedmål.....	6
5. Gjennomføring.....	6
5.1. Tillaging av medisineret fôr.....	8
5.2. Beregning av intuberingsdose:.....	9
5.3. Intubering.....	9
5.4. Utføring av medisineret fôr i forsøk 4.....	10
5.5. Avliving og prøvetaking.....	10
5.6. Bestemming av antallet bendelorm.....	11
5.7. Utvikling av bioassay.....	11
5.8. Innsamling av bendelorm.....	11
5.9. Gjennomføring av tester.....	11
5.10. Fortynning og konsentrasjoner.....	11
5.11. Statistikk.....	12
6. Resultater.....	12
6.1. Effekt av bendelorm på fiskens vekt.....	12
6.2. Vekt i feltforsøk.....	12
6.3. Antall bendelorm etter behandling.....	14
6.4. Effekt av piperonylbutoxid (PBO).....	17
6.5. "Dropouts".....	17
6.6. Resultater fra bioassay.....	17
7. Diskusjon.....	18
7.1. Effekt av bendelorm på fiskens vekt.....	18
7.2. Feltforsøk, vekt.....	19
7.3. Feltforsøk, antall bendelorm etter behandling.....	19
7.4. Effekter av PBO.....	20
7.5. Bioassay.....	20
9. Konklusjoner.....	20
10. Referanser.....	21

1. Sammendrag

I dette prosjektet ble effekten av de alternative behandlingsmidlene albendazol, morantel, oxfendazol, clorsulon, oxibendazol, thiabendazol og triclabendazol sammenlignet med effekten av praziquantel og fenbendazol.

Forsøkene i 2007 ble utført på Marine Harvest Forsøksanlegg, CAC Langavika ved Hjelmeland i september – oktober. Fisken ble intubert pellet ($\approx 0.75\%$ av kroppsvekt) med 150 % dose legemiddel. Resultatet ble evaluert etter 13 dager (forsøk 1) og 15 dager forsøk 2. Forsøk 2 ble utført i samme anlegg, samtidig som det ble utført en feltbehandling med praziquantel.

Dosetitrering ved intubasjon ble utført på Marine Harvest, Lindvik i Vindafjord i perioden 27/5 – 10/6. 2008. Fisken ble intubert etter samme protokoll som de to første forsøkene ($\approx 0.75\%$ av kroppsvekt), men med ulike doser. Resultatet ble evaluert 14 dager etter intubering. Feltutføring med 10 mg/ kg praziquantel og 30 mg/ kg oxibendazol ble utført på Marine Harvest Fosså, Hjelmeland i 10/11 – 17/11.2008. Fisken ble gitt 0.5 % medisinfôr av kroppsvekt i 2 dager. I dette forsøket ble effekten evaluert 7 dager etter start av utføring.

Det ble utført 6 studier med praziquantel i bioassay. Første testen ble utført på et anlegg med antatt redusert følsomhet for praziquantel. De andre studiene ble utført på følsom bendelorm samtidig med intubasjon eller medisinerings slik at resultatene kunne verifiseres.

Resultatene viste: a) det alternative middelet med best effekt ved intubasjon var oxibendazol, b) behandling med 30 mg oxibendazol / kg fisk med feltutføring (0.5 % i 2 dager) resulterte i rask reduksjon i appetitt, noe som gjorde det umulig å gi fisken riktig dose, c) effekt av praziquantel i bioassay viser samme effekt som ved intubering eller feltbehandling d) bioassay er standardisert med 12 timers eksponering i medisinsk fysiologisk saltvann og 5 - 7 cm lange biter med scolex .

Det ble også testet kombinasjon med piperonylbutoksid (PBO) (synergist – enzymhemmer) for å sjekke om metabolsk detoksifisering ved økt enzymaktivitet kunne være resistensmekanisme. Det ble kun testet følsomme populasjoner, noe som ga en liten effekt av PBO. Metabolsk detoksifisering kan derfor ikke utelukkes som resistensmekanisme.

2. Bakgrunn

I flere oppdrettsdistrikter har det vært problemer med behandling av bendelormen *Eubothrium* sp., på grunn av manglende effekt av det antiparasittære middelet praziquantel. Oppdrettsnæringen har pr. i dag ingen gode alternative midler, og har akutt behov for nye behandlingsmidler. Dette kan skaffes ved å teste ut alternative behandlingsmidler med etablerte MRL (Maximum Residue Limit) verdier for andre produksjonsdyr. Disse kan så benyttes i henhold til kaskadepriippet (direktiv 2001/ 82/ EF, artikkel 10). Behandlet fisk vil få en tilbakeholdelsestid på 500 døgngrader. Det er tidligere utført flere pilotprosjekter, og resultatene fra disse er tatt med i utformingen av prosjektet. Dette prosjektet ble initiert av oppdrettsnæringen, og finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF), Skretting AS og Marine Harvest.

3. Innledning

Bendelormen *Eubothrium* sp. hos laks tilhører phylum; *Platyhelminthes* (flatmarker), subklasse *Eucestoda* og overfamilie *Pseudophyllidea*. Den finnes og smittes både i ferskvann og i saltvann. Det er derfor mulig at det er to ulike arter. Ferskvannsformen benevnes som

Eubothrium crassum, mens saltvannsformen benevnes foreløpig som *Eubothrium* sp. (Saksvik et al. 2001). Bendelorm består av en hodedel (*scolex*) med et festeapparat, og en segmentdel (*strobila*) der hvert segment (*proglottid*) har både hannlige og hunnlige kjønnsorganer. Bendelorm er derfor hermafroditiske, og både seksuell og aseksuell formering er mulig. Bendelormer mangler munn og tarmsystem, men tar næringsstoffer direkte opp gjennom kroppsoverflaten. *Eubothrium* ssp. er vanlig hos salmonider på den nordlige halvkule. Fisken er sluttvert. Egg kommer ut via feces. Egget blir spist av et krepsdyr (copepod?) som er mellomvert. I saltvann er det benyttet *Acartia tonsa* i en smittemodell (Saksvik et al. 2001). I første mellomvert utvikles det en *proceroid*. Fisk i sjøvann får i seg parasitten enten ved å spise mellomverten, eller mellomverten følger med sjøvannet når fisken drikker.

Bandelorm (*Eubothrium* sp.) forårsaker store tap for norsk oppdrettsnæring, ved at den gir redusert vekst og økt førfaktor på infisert fisk. Det er funnet signifikante forskjeller i vekst hos laks i oppdrett mellom laks med uten *Eubothrium* sp. (Bristow & Berland 1991, Saksvik 1998, Sundnes 2003). Det er også mulig at immunforsvaret blir påvirket negativt ved infeksjon av bendelorm (Are Nylund, UiB pers. med.). Det er også etisk uforsvarlig å la fisk gå igjennom produksjonssyklusen med en vedvarende infeksjon med bendelorm. Et annet viktig element er at for laks eller ørret som blir solgt usløyd, vil funn av bendelorm ha negative markedsmessige konsekvenser.

Bandelorm blir i dag behandlet med legemiddelet praziquantel (prazinoisoquinolin). Denne forbindelsen er markedsført under preparatnavnet Droncit vet. til hund, katt og hest. Til laks benyttes en formulering som medisinpellets produsert av et førfirma med tillatelse til slik produksjon. Det er rapportert om økende problemer med effekt av praziquantel. I 2005 ble det utført et pilotprosjekt; FHF 2005: (www.fiskerifond.no/files/projects/attach/551024.pdf). Denne studien ga en klar indikasjon på at *Eubothrium* sp. hadde utviklet resistens mot praziquantel på den aktuelle lokaliteten. Fenbendazol (Panacur, Intervet) er brukt i begrenset grad, men dette legemiddelet medfører nedsatt appetitt etter behandling. Det er ikke anbefalt å behandle med fenbendazol når sjøtemperaturen er under 10 °C.

Et bioassay er tidligere utviklet for lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) (Sevatdal & Horsberg, 2003). Med et slikt bioassay kan sensitiviteten til en organisme overfor et behandlingsmiddel bestemmes. Det er derfor også mulig å kartlegge mulig utvikling av resistens ved å samle inn og utføre bioassay med ulike populasjoner av skadeorganismen. Dette er utført tidligere med lakselus (Sevatdal et al. 2005). Denne metoden gir også muligheter for rask screening av alternative behandlingsmidler og undersøkelse av resistensmekanismer ved hjelp av ulike enzymhemmere.

4. Hovedmål

Hovedmålene i denne studien har vært:

1. Teste samtlige tilgjengelige alternative behandlingsmidler i forsøk med laks infisert med *Eubothrium* sp. – registrere effekt og bieffekter.
2. Fortsette utviklingen av et bioassay for måling av *Eubothrium* sp. sensitivitet overfor aktuelle behandlingsmidler.

5. Gjennomføring

Det ble utført i alt 3 forsøk med intubering av laks, og 1 forsøk med utføring for å teste alternativ substans. De to første forsøkene (2007) ble utført på CAC Langavika ved Hjelmeland. Det var ikke mistanke om resistens mot praziquantel i dette anlegget. Det tredje

forsøket med intubering ble utført ved Marine Harvest Lindvik i Vindafjord. Hensikten med dette forsøket var å teste ut ulike doser av alternative substanser, og å undersøke effekten av synergisten piperonylbutoksid (PBO) (synergist - enzymhemmer). Det siste forsøket med utføring av alternativt middel ble utført ved Marine Harvest Fosså i Hjelmeland. Forsøkene er beskrevet i tabell 1.

Etter forsøk 2 på CAC Langavika i 2007 ble det utført en behandling med praziquantel i hele anlegget. Dette gjorde det mulig å sammenligne effekt i en forsøksstudie med intubasjon, med effekt av en vanlig behandling i felt der fisken spiser føret. Det samme ble også undersøkt på Fosså i 2008. Anbefalt behandlingsdose for praziquantel og fenbendazol er 10mg/ kg (5 mg/kg i 2 dager). I forsøkene ble fisken intubert en dose som tilsvarer 150 % av dette, tabell 1. Vanntemperatur under forsøkene er beskrevet i tabell 2.

Tabell 1. Forsøk, behandlingsmiddel, doser og merking. Start – intuberingstidspunkt, Slutt – avlivning og prøvetaking.

Forsøk	Start – Slutt	Behandlingsmiddel (kode)	Dose	Merking
Forsøk 1	18/ 9 - 1/10 2007	Kontroll (K1)	0 mg/ kg	1
		Praziquantel (P1)	15 mg/ kg	2
		Fenbendazol (F1)	15 mg/ kg	3
		Oxfendazol (OF1)	15 mg/ kg	4
		Oxibendazol (OB1)	15 mg/ kg	1-2
		Clorsulon (C1)	10.5 mg/ kg	1-3
		Morantel (M1)	15 mg/ kg	2-4
Forsøk 2	2/10 – 17/10 2007	Kontroll (K2)	0 mg/ kg	1
		Praziquantel (P2)	15 mg/ kg	2
		Praziquantel 75% (P3)	7.5 mg/ kg	3
		Albendazol (A1)	15 mg/ kg	4
		Thiabendazol (TH1)	15 mg/ kg	1-2
		Triclabendazol (TR1)	15 mg/ kg	1-3
		Praziquantel* (P4)	10 mg/ kg	Umerket
Forsøk 3	27/5 – 10/6 2008	Praziquantel 150 % (P5)	15 mg/ kg	Fettf. + 1-4
		Praziquantel 75% (P6)	7.5 mg/ kg	Fettf. + 1-2
		Praz. 75% + PBO (P7)	7.5 + 30 mg PBO/kg	Fettf. + 1-3
		Fenbendazol 100% (F2)	10 mg/ kg	Fettf. + 3
		Fenbendazol 50% (F3)	5 mg/ kg	Fettf. + 1
		Fenb. 50% + PBO (F4)	5 + 30 mg PBO/kg	Fettf. + 2
		Oxibendazol 200% (OB2)	20 mg/ kg	1-4
		Oxibendazol 300% (OB3)	30 mg/ kg	1-3
		Clorsulon 200 % (C2)	14 mg/ kg	3
		Clorsulon 300% (C3)	21 mg/ kg	4
		Kontroll (K3)	0 mg/kg	Fettf. + 2-3
Forsøk 4	10/11 – 17/11 2008	Praziquantel (P8)	10 mg /kg	Umerket
		Praziquantel* (P9)	10 mg/ kg	Umerket
		Oxibendazol (300%) (OB4)	30 mg/ kg	Umerket
		Kontroll (K4)	0 mg/ kg	Umerket

* Medisinering av anlegget

Formatert: Norsk (bokmål)

Formatert: Norsk (bokmål)

Tabell 2. Temperatur under feltforsøkene

Forsøk	Tidsperiode	Lokalitet	Middeltemp.(min – max)
1 og 2	18.9 – 17.10	CAC Langavika	12 °C (11 – 13.5 °C)
3	27/5 – 10/6	MHN Lindvik	11.9 °C (9.2 – 16.2 °C)
4	10/11 – 17/11	MHN Fosså	10.1 °C (9.2 – 10.8 °C)

5.1. Tillaging av medisineret fôr

Medisineret fôr ble laget av Skretting på Averøya. Til forsøk 1 og 2 (2007) ble medisinfôret laget slik at det var 2 g aktiv substans/ kg fôr. Det ble laget 25 kg av hver type. Det var derfor nødvendig med totalt 50 g av hver substans.

Tabell 3. Utregning av mengde legemiddel / rensustans som ble tilsatt 25 kg fôr

Behandl. middel	Preparat navn	Konsentrasjon i legemiddel Pakningsstørrelse	Ant. g/ ml aktiv substans / legemiddel tilsatt 25 kg fôr
Praziquantel		Rensustans	50 g
Fenbendazole	Panacur	Rensustans	50 g
Albendazol	Valbazen	19 mg/ml	2640 ml
Clorsulon	Curatrem	85 mg/ml	589 ml
Morantel	Paratect Vet	58 mg /ml	863 ml
Oxfendazole	Systemex	750 g depotbolus	50 g
Oxibendazole	Anthelcide	Hver sprøyte inneholder 24 g pasta med 22.7 % a.s. = 227 mg/ g	221 g
Thiabendazole		Rensustans	50 g
Triclabendazol	Fasinex 10%	10 g 100 ml (100 mg/ ml)	500 ml

Medisineret fôr med albendazol ble ikke laget på forhånd av Skretting. Fordi væskemengden var så stor at fôret ville bli for fuktig og dermed ikke holdbart. En passende mengde ble derfor laget i forkant av intubering ved å tilsette 15.84 ml til 150 gram standard medisinpellet. Fôr og pellet ble blandet i et begerglass, og rørt til all væsken var sugd inn i pelleten. Deretter ble fôret tørket over natten i romtemperatur.

Det ble bestilt Fasinex 10% (Triclabendazol), men ved en feil kom det Fasinex 5 % i stedet. Dette ble oppdaget etter at medisinfôret var ferdig laget. Medisinfôret med triclabendazol inneholdt derfor halv mengde aktiv substans. Konsentrasjonen i fôr til intubering ble derfor økt til 2 g/ kg ved å tilsette 15 ml Fasinex (5%) til 150 g standard medisinpellet. Fôr og pellet ble blandet i et begerglass. Dette ble rørt sammen til all væsken var sugd inn i pelleten. Deretter ble fôret tørket over natten i romtemperatur.

I forsøk 3 ble dosen i medisinfôret med oxibendazol og clorsulon doblet til 4 g/ kg, ved å tilsette henholdsvis 4.4 g Anthelcide og 11.76 ml Curatrem til 500 gram av hver av de to fôrtypene. Deretter ble det medisinerete fôret tørket over natt i romtemperatur. I dette forsøket ble piperonylbutoxid (PBO) tilsatt slik at dosen ble 30 mg/ kg fisk, dvs medisinfôret med praziquantel ble tilsatt 6 mg PBO / g fôr (200 gram + 1,2 ml PBO \approx 1.3 mg pr pellet), og medisinfôret med fenbendazol ble tilsatt 8 mg PBO/ g fôr (250 gram + 2 ml PBO \approx 2.2 mg pr pellet) (PBO veier 1.046 g/ml).

Til forsøk 4 (testing ved utføring) laget Skretting medisinfôr som inneholdt 3 g/ kg oxibendazol ved å blande 331 gram Anthelcide inn i 25 kg standard 7 mm medisinpellet. I det samme forsøket ble det benyttet tilsvarende medisinfôr med 1 g/ kg praziquantel.

5.2 Beregning av intuberingsdose:

Det ble veid 10 pellet fra samtlige typer medisineret fôr, unntatt albendazol (Valbazen) og triclabendazol (Fazinex). Gjennomsnittsvekt på pelleten var 0,22 gram.

$$25\ 000\ \text{g} \div 0.22\ \text{g} = 113\ 636.36\ (\text{antall pellet i 25 kg fôr})$$

$$25\ \text{kg fôr er tilsatt 50 g aktiv substans: } 50\ \text{g} \div 113\ 636.36 = 0.00044\ \text{g} (4.4 \times 10^{-4}) = 0.44\ \text{mg}$$

Hver pellet inneholder derfor 0.44 mg aktiv substans i medisineret fôr som inneholder 2 g/kg. I forsøk 3 (2008) ble dosen doblet til 0.88 mg kg.

Antall pellet for intubering ble beregnet og avrundet etter nærmeste hele pellet i henhold til tabell 4 i forsøk 1 og 2 (2007), og iht tabell 5 i forsøk 3 (2008).

Tabell 4. Beregning av doser i henhold til fiskevekt i forsøk 1 og 2 (2007)

Fiskevekt (gram)	Antall g med. Fôr – antall pellet	Clorsulon
400 - 449	3.00 - 14 pellet	2.0 - 9 pellet
450 - 499	3.375 - 15 pellet	2.25 - 10 pellet
500 - 549	3.75 - 17 pellet	2.5 - 11 pellet
550 - 599	4.125 - 19 pellet	2.75 - 12 pellet
600 - 649	4.50 - 20 pellet	3.0 - 14 pellet
650 - 750	4.8 - 21 pellet	3.2 - 15 pellet
>750	5.1 - 22 pellet	3.5 - 16 pellet

Tabell 5. Beregning av doser iht fiskevekt i forsøk 3 (2008). P5 - Praziquantel 150 %, P6 - Praziquantel 75%, P7 - Praz. 75% + PBO, F2 - Fenbendazol 100%, F3 - Fenbendazol 50%, F4 - Fenb. 50% + PBO, OB2 - Oxibendazol 200%, OB3 - Oxibendazol 300%, C2 - Clorsulon 200 %, C3 - Clorsulon 300% og K3 - Kontroll

Fiskevekt (gram)	Antall pellet intubert										
	P5	P6	P7	F2	F3	F4	OB2	OB3	C2	C3	K3
700 - 799	26	13	13	17	9	9	19	28	15	20	26
800 - 899	28	14	14	18	10	10	20	30	16	22	28
900 - 999	30	16	16	20	10	10	22	34	18	26	30
1000 – 1099	34	18	18	22	12	12	24	36	20	28	34
1100 - 1199	38	20	20	24	12	12	26	42	22	30	38
>1200	42	22	22	28	14	14	30	46	26	34	42

5.3. Intubering

En minimerd ble plassert i en merd i anlegget. Fisken i den aktuelle merden ble sultet den dagen det ble intubert. Før intubasjon ble fisken moderat bedøvet med 50 mg/l metacain (MS 222) i ca. 3 minutter, deretter veid. Vekten ble notert på et eget skjema, og en person laget en ferdig dose med riktig antall pellet iht fisken vekt i en intuberingssonde. Intubasjonen ble gjennomført med sonder laget av 10 ml engangspipetter som var kuttet og avrundet i enden,

og 1 ml. engangspipetter ble brukt til stempel. Fisken ble så intubert mens den lå på siden. Sonden ble stukket ned gjennom fiskens spiserør og pelleten applisert i magesekken. Deretter ble fisken blekkmerket (Panjet) ventralt i henhold til tabell 2, og overført til et oppvåkingskar der eventuell oppgulpning kunne registreres. Etter oppvåkning ble fisken overført til minimerden. Antall bendelorm ble registrert etter 13 dager i forsøk 1 og 15 dager i forsøk 2.

Figur 1. Intubering (Foto: Lene Høgset, Intervet Schering-Plough)



5.4. Utføring av medisineret fôr i forsøk 4

200 fisk ble plassert i hver av to minimerder. Fisken ble deretter akklimatisert til tilnærmet normal appetitt. (1 uke). Fôr med praziquantel (1 gram/ kg – standard medisinfôr) ble utført i den ene merden og fôr med oxibendazol (3 gram/ kg) ble gitt til den andre merden. Utføring ble utført for hånd, og det ble gitt 0.5 % av total bioamasse pr dag i 2 dager. Deretter ble det fôret ut standard vekstfôr. Appetitten ble nøye registrert både under medisinerings og i dagene etterpå fram til prøveuttak (5 dager), se tabell 9.

5.5. Avliving og prøvetaking

Laksen ble avlivet med slag i hodet, gruppetilhørighet bestemt og deretter veid. Det ble tatt ut prøver fra tarm for å vurdere bieffekter av fem fisk i hver gruppe. Prøvene ble fiksert med 4 % formalin. Intervet Schering-Plough har laget histogiske snitt av prøvene, men de er foreløpig ikke analysert.

5.6. Bestemming av antallet bendelorm

Mage-pylorus-tarm ble tatt ut og fryst ned før senere registrering av bendelorm. Ved bestemming av antall bendelorm ble mage-pylorus-tarm klippet opp på langs. Innholdet ble deretter presset ut i en bolle med vann, også innholdet i samtlige blindsekker. Bendelorm sank til bunnen mens det øvrige tarminnholdet fløyt i vannet. Innholdet ble vasket ved å skifte vann flere ganger. Antallet bendelorm ble registrert ved å telle ”hoder” (*scolex*) eller avsmalende *strobila* der *scolex* manglet.

5.7. Utvikling av bioassay

Undersøkelsene denne gangen ble basert på resultatet fra pilotprosjektet i 2005 (FHF 2005).

5.8. Innsamling av bendelorm

Oppklippede mage/tarmpakker ble lagt i fysiologisk saltvann i 1 – 3 timer. Deretter ble bendelorm som hadde løsnet av seg selv samlet inn. Enkelte ble også fjernet manuelt fra pylorus. Fysiologisk saltvann ble laget på stedet av sjøvann tilsatt ferskvann. Saltholdighet ble kontrollert med et salinometer (YSI 85, Oxygen, Conductivity, Salinity & Temperature, Ohio, USA).

5.9. Gjennomføring av tester

Det ble gjennomført i alt 6 bioassay med praziquantel. Første test ble utført med bendelorm samlet inn ved Marine Harvest Varakjelen ved Varaldsøy i Hardanger. Det ble også gjennomført 3 tester med følsom bendelorm samlet inn ved Marine Harvest CAC Langavika. I 2008 ble det gjennomført 2 bioassay (Marine Harvest Lindvik, Vindafjord og Marine Harvest Fosså, Hjelmeland), begge med følsom bendelorm.

Bioassayene ble utført med konsentrasjonene som er vist i tabell 5, i fysiologisk saltvann ved 12 °C.

Følgende ble testet ut:

- Responsen til biter av bendelorm (ca 5 - 7 cm) med hele individer, og 5 - 7 cm lange biter med *scolex*.
- Validering av effekt av intubering med effekt av testing i bioassay (viser testing bioassay samme resultat som effekt av feltbehandling/ intubering)
- Validering om resultatet blir det samme dersom testen gjentas
- Standardisering ved å benytte medisinsk fysiologisk saltvann.

5.10. Fortynning og konsentrasjoner

Praziquantel løses dårlig i vann, men godt i etanol. Stam-løsningen ble laget på følgende måte: 500 mg (0.5 g) praziquantel + 50 ml etanol = 10 g / l.

Deretter ble 100 ml av eksponeringsløsningene laget i henhold til tabell 8. Testene utført fra og med 18. oktober ble utført med medisinsk fysiologisk saltvann (Ecotainer® NaCl 0,9% B. Braun, Melsungen AG, Tyskland). Grupper av bendelorm ble eksponert i polystyren prøveglass med skrukork. Ved evaluering ble bendelorm og noe av eksponeringsvæsken overført til en petriskål. Bevegelse ble brukt som indikasjon på at bendelormen var levende. Individer uten bevegelse, selv etter berøring, ble klassifisert som døde.

Tabell 6. Fortynning av praziquantel til bruk i bioassay med *Eubothrium sp.*

Løsning (konsentrasjon)	Fys.saltvann (ml)	Eksponeringsløsn. Konsentrasjon
1.0 ml stamløsning	+ 99 *	100 mg/ l (100 ppm)
10 ml 100 ppm løsn.	+ 90	10 mg/ l (10 ppm)
10 ml 10 ppm løsn.	+ 90	1 mg/ l (1 ppm / 1000 ppb)
10 ml 1 ppm løsn.	+ 90	0.1 mg/ l (100 ppb)
Kontroll	100 ml	0

* 1.0 ml stamløsning inneholder 10 mg. 10 mg i 100 ml = 100 mg/ l (100 ppm)

5.11. Statistikk

Alle statistiske analyser er utført med JMP 7.0.1(SAS Institute). Antall bendelorm i fisken etter behandling var ikke normalfordelt. Derfor er median benyttet for sammenligning av effekt. Forskjeller i antall bendelorm pr gruppe er også analysert med kontingensanalyse. Effekt av bendelorm på fiskens vekt er undersøkt ved å sammenligne gjennomsnittsvekten til fisken i de ulike kategoriene med t-test ($p < 0.05$). Kun fisk i kontrollgruppene (K1, K2, K3 og K4) er benyttet til dette. Følsomheten til bendelorm i bioassay ble registrert som **LD₅₀**, den konsentrasjonen (ppm) praziquantel som dreper 50 % av individene. Estimering av LD₅₀ er utført med probit analyse (POLO, LeOra Software, Menlo Park, California).

6. Resultater

6.1. Effekt av bendelorm på fiskens vekt

Eventuell effekt av bendelorm på fiskens vekt er undersøkt ved å sammenligne gjennomsnittsvekt for fisk i kontrollgruppene (K1, K2, K3 og K4) i de ulike kategoriene som er benyttet i kontingensanalyse; Fisk med 0 bendelorm blir kategori 1, fisk med 1 bendelorm er kategori 2, fisk med 2 – 4 bendelorm er kategori 3 og fisk med 5 eller flere bendelorm er kategori 4.

Tabell 7. Kategori (antall bendelorm) og vekt i kontrollgrupper

Gruppe	Gjennomsnittsvekt for hver kategori (gram)				Sign. forskjell innen gruppen
	1 (n)	2 (n)	3 (n)	4 (n)	
K1	604(6)	589(6)	574(13)	483(5)	Nei
K2	590(2)	549(8)	639(12)	650(9)	Nei
K3	856(10)	842(12)	563(4)	428(2)	Ja
K4	852(16)	822(17)	772(12)	817(5)	Nei

Med unntak av K2, er reduksjon i vekt korrelert med økt antall bendelorm. Det er i samtlige tilfeller en reduksjon i vekt fra 0 bendelorm til 1 bendelorm. Det er imidlertid varierende antall individer i hver gruppe når det gjøres på denne måten. I K2, kategori 1 og i K3 kategori 4, er det kun 2 fisk. Det er signifikante forskjeller kun innen gruppe K3. Kategori 1 er sign. forskjellig fra kategori 3 og kategori 4 (t-test, $p < 0.05$).

6.2. Vekt i feltforsøk

Gjennomsnittsvekt ved start av intubering i feltforsøk 1 (18.09.07) var 571.3 gram (Std = 115.2, n=217). Ved avslutning (01.10.07), hadde kontrollgruppen en gjennomsnittsvekt på 568 (tabell 8). Denne gruppen hadde en gjennomsnittsvekt på 552.8 ved start. Dette gir en

vektøkning på 2.8 % i perioden på 13 dager som forsøket varte. Ved start av feltforsøk 2 (02.10.07), hadde fisken en gjennomsnittsvikt på 580.7 (Std = 108.4, n = 190). Dette betyr at veksten i den merden forsøksfisken ble hentet fra, hadde en vektøkning på 1.6 %.

I feltforsøk 2 hadde kontrollfisken en vektøkning fra 608.4 gram ved start, til 616.1 gram ved avslutning (17.10.07) etter 15 dager. (Tabell 4). Dette er en vektøkning på 1.3 %.

De fleste gruppene hadde en vektøkning i løpet av forsøkene, med unntak av oxibendazol (Feltforsøk 1) og albendazol (Feltforsøk 2).

Gjennomsnittsvikten i feltforsøk 3 (27.05.08) ved start var 850.3 gram (Std = 228.4, n= 330). Ved avslutning hadde kontrollgruppen en gjennomsnittsvikt på 777 gram (Std = 41.5, n=28). Den samme kontrollgruppen hadde en gjennomsnittsvikt på 850.5 (Std = 40.1, n=30) ved start. Kontrollgruppen hadde en negativ endring i vekst på - 8.6% i løpet av de 14 dagene forsøket varte. De eneste gruppene med vektøkning i dette forsøket var P5 og F2.

Ved start av forsøk 4, dvs 1 dag med utføring av praziquantel (P8) og oxibendazol (OB4), ble det tatt ut 50 kontrollfisk (K4) for å finne gjennomsnittsvikt for beregning av doser, og antall bendelorm før behandling. Det viste seg at det var stor variasjon i vekt innen kontrollgruppen. For at ikke dosen skulle bli for lav, ble de åtte minste fiskene ikke tatt med ved beregning av vekt. Dette ga en gjennomsnittsvikt på 930.8 gram (Std = 45.6, n=42). I forsøksmerkene var størrelsen mer homogen, fordi det ble lagt vekt på å ikke benytte "tapere" eller spesielt liten fisk i disse merkene, for å unngå dødelighet og dermed feil ved beregning av doser.

Tabell 8. Vektforandring

Forsøk	Behandlingsmiddel (kode)	Dose	Forandring i vekt		
			Start	Slutt	%
Forsøk 1	Kontroll(K1)	0 mg/ kg	553	568	2.7
	Praziquantel (P1)	15 mg/ kg	540	565	4.6
	Fenbendazol (F1)	15 mg/ kg	573	586	2.3
	Oxfendazol (OF1)	15 mg/ kg	565	581	2.8
	Oxibendazol (OB1)	15 mg/ kg	622	614	-1.3
	Clorsulon (C1)	10.5 mg/ kg	571	603	5.6
	Morantel (M1)	15 mg/ kg	575	592	2.9
Forsøk 2	Kontroll (K2)	0 mg/ kg	608	616	1.3
	Praziquantel (P2)	15 mg/ kg	601	631	5.0
	Praziquantel 75% (P3)	7.5 mg/ kg	559	582	4.1
	Albendazol (A1)	15 mg/ kg	578	576	-0.3
	Thiabendazol (TH1)	15 mg/ kg	585	608	3.9
	Triclabendazol (TR1)	15 mg/ kg	551	584	6.0
Forsøk 3	Praziquantel 150 % (P5)	15 mg/ kg	858	896	4.4
	Praziquantel 75% (P6)	7.5 mg/ kg	838	787	-6.1
	Praziquantel 75% + PBO (P7)	7.5 mg/ kg + PBO	861	785	-8.6
	Fenbendazol 100% (F2)	10 mg/ kg	740	765	3.4
	Fenbendazol 50% (F3)	5 mg/ kg	926	872	-5.8
	Fenbendazol 50% + PBO (F4)	5 mg/ kg + PBO	831	797	-4.1
	Oxibendazol 200% (OB2)	20 mg/ kg	865	773	-10.6
	Oxibendazol 300% (OB3)	30 mg/ kg	876	804	-8.2
	Clorsulon 200 % (C2)	14 mg/ kg	838	791	-5.6
	Clorsulon 300% (C3)	21 mg/ kg	870	793	-8.8

Formatert: Norsk (bokmål)

Formatert: Norsk (bokmål)

	Kontroll (K3)	0 mg/kg	850	777	-8.6
Forsøk 4	Praziquantel (P8)	10 mg /kg	930	1063	12.5
	Oxibendazol (300%) (OB4)	30 mg/ kg	930	908	-2.3
	Kontroll (K4)	0 mg/ kg	930	-	-

I feltforsøk 4 ble utføret mengde fôr registrert, både medisineret fôr og vanlig fôr. Fisken ble føret for hånd. Det var en helt tydelig redusert appetitt i merden som fikk oxibendazol (Tabell 9). Dette ble også registrert første dagen med medisinføring. Ved første utføring ble det gitt 800 gram, av totalt 900 gram ($\approx 0.5\%$). Det var god appetitt i begge merdene, og ingen forskjell i lysten til å spise. De siste 100 gram ble gitt på slutten av dagen (ca 13:00). Fisken som fikk praziquantel spiste fortsatt godt, mens fisken som fikk oxibendazol hadde dårlig appetitt. Hele dosen, dvs 900 gram medisineret fôr ble gitt til begge gruppene dag 2 (11.11), men fisken som fikk oxibendazol hadde dårlig appetitt, og fikk trolig ikke i seg riktig dose.

Tabell 9. Utføret mengde i feltforsøk 4

Dato	Fortype	Mengde	Utføret (gram)	
			P8	OB4
10.11	Medisinfor	0,5%	900	900
11.11	Medisinfor	0,5%	900	900
12.11	Vanlig	Appetitt	1230	150
13.11	Vanlig	Appetitt	3236	585
14.11	Vanlig	Appetitt	1982	940
15.11	Vanlig	Appetitt	3565	1419
16.11	Vanlig	Appetitt	2100	982

6.3. Antall bendelorm etter behandling

Antall bendelorm i fisken etter behandling var ikke normalfordelt. Det er derfor mest korrekt å vise resultatet som median for hver gruppe, og ikke gjennomsnitt.

Tabell 10. Antall bendelorm i hver gruppe vist som median

Forsøk	Behandlingsmiddel (kode)	n	Median (25% - 75% persentil)
Forsøk 1 (2007)	Kontroll (K1)	30	2 (1 - 4)
	Praziquantel (P1)	31	0 (0 - 1)
	Fenbendazol (F1)	30	0 (0 - 1)
	Oxfendazol (OF1)	27	1 (1 - 3)
	Oxibendazol (OB1)	31	1 (0 - 1)
	Clorsulon (C1)	30	1 (0 - 3)
	Morantel (M1)	30	2 (1 - 4)
Forsøk 2 (2007)	Kontroll (K2)	31	3 (1 - 5)
	Praziquantel (P2)	31	0 (0 - 1)
	Praziquantel 75% (P3)	27	0 (0 - 1)
	Albendazol (A1)	29	1 (1 - 2)
	Thiabendazol (TH1)	30	3 (2 - 5)
	Triclabendazol (TR1)	28	2 (1 - 4)
	Praziquantel* (P4)	25	1 (0 - 1)
Forsøk 3 (2008)	Praziquantel 150 % (P5)	15	0 (0 - 0)
	Praziquantel 75% (P6)	27	0 (0 - 1)

Formatert: Norsk (bokmål)

Formatert: Norsk (bokmål)

Formatert: Engelsk (USA)

Formatert: Norsk (bokmål)

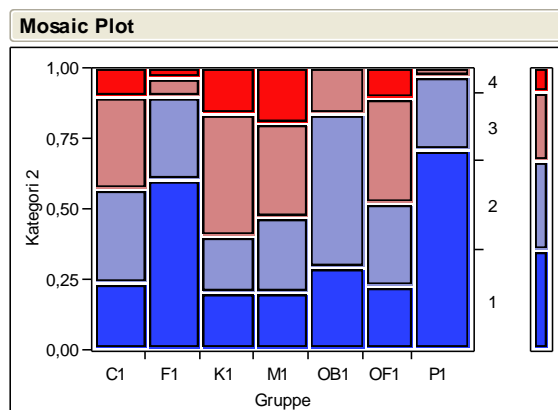
	Praz. 75% + PBO (P7)	27	0 (0 – 1)
	Fenbendazol 100% (F2)	19	0 (0 – 0)
	Fenbendazol 50% (F3)	30	0 (0 – 1)
	Fenb. 50% + PBO (F4)	29	0 (0 – 0.5)
	Oxibendazol 200% (OB2)	28	0 (0 – 1)
	Oxibendazol 300% (OB3)	25	0 (0 – 1)
	Clorsulon 200 % (C2)	23	0 (0 – 1)
	Clorsulon 300% (C3)	23	1 (0 – 1)
	Kontroll (K3)	28	1 (0 – 1)
Forsøk 4	Praziquantel (P8)	50	0 (0 – 1)
(2008)	Praziquantel* (P9)	50	0 (0 – 0)
	Oxibendazol (300%) (OB4)	50	1 (0 – 2)
	Kontroll (K4)	30	1 (0 – 2)

* Medisinering av anlegget

Resultatet er også vist som kontingensanalyse

Feltforsøk 1

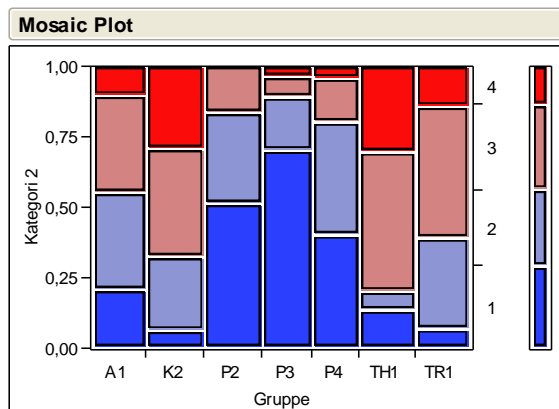
Figur 2. Figuren viser resultat av kontingensanalyse i feltforsøk 1. Følgende kategorier er benyttet: 0 bendelorm = 1 (rødt), 1 bendelorm = 2 (grønt), 2 – 4 bendelorm = 3 (blått) og 5 eller fler = 4 (brunt). Gruppene er kodet iht tabell 1 og 8.



Resultatene viser at gruppen som fikk praziquantel (P1) har flest fisk uten bendelorm (22/ 31). Fenbendazol (F1) har også god effekt. Andelen fisk uten bendelorm er (9/ 31) i gruppen som fikk oxibendazol (OB1), men her er andelen fisk med kun en bendelorm høy (17/ 31). Den laveste andelen fisk uten bendelorm finnes i gruppen som fikk morantel (M1) (6/ 30), og i kontrollgruppen (K1) (6/ 30). Dette er en prevalens på 80 %.

Feltforsøk 2

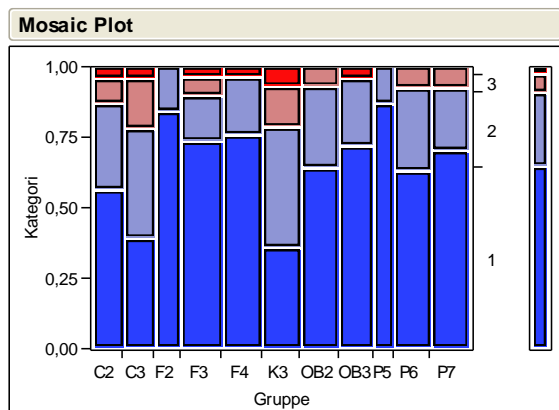
Figur 3. Figuren viser resultat av kontingensanalyse i forsøk 2. Følgende kategorier er benyttet: 0 bendelorm = 1 (rødt), 1 bendelorm = 2 (grønt), 2 – 4 bendelorm = 3 (blått) og 5 eller flere = 4 (brunt). Gruppene er kodet iht tabell 1 og 8.



Resultatene viser at gruppen som fikk praziquantel 75 % dose (P3) har flest fisk uten bendelorm (19/ 27) i dette forsøket. Praziquantel 150 % dose (P2) har også god effekt (16/ 31). Albendazol (A1) har en viss effekt (6/ 29). Den laveste andelen fisk uten bendelorm av de behandlede gruppene er triclabendazol (TR1) (2/ 28). I kontrollgruppen (K2) er det en prevalens for bendelorm på 90.6 % (2/ 31).

Feltforsøk 3

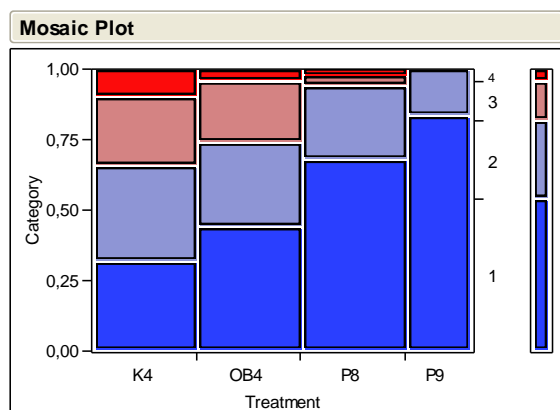
Figur 4. Figuren viser resultat av kontingensanalyse i forsøk 3. Følgende kategorier er benyttet: 0 bendelorm = 1 (rødt), 1 bendelorm = 2 (grønt), 2 – 4 bendelorm = 3 (blått) og 5 eller flere = 4 (brunt). Gruppene er kodet iht tabell 1 og 8.



Resultatene viser at fenbendazol (F2) og praziquantel (P5) har god effekt i anlegget, henholdsvis 16 fisk av totalt 19 (16/ 19) og 13 av totalt 15 (13/ 15). Piperonylbutoksid tilsatt fenbendazol (F4) og praziquantel (P7) har liten effekt sammenlignet med tilsvarende grupper uten PBO (henholdsvis F3 og P6). Clorsulon (C2 og C3) har liten effekt, mens oxibendazol har en viss effekt. I gruppen OB2 (200%) er det 18 av 28 fisk uten bendelorm (18/ 28) og i gruppen OB3 (300%) er det 18 av 25 fisk uten bendelorm (18/ 25). I kontrollgruppen er det en prevalens på 64 %, dvs 10 av totalt 28 fisk er uten bendelorm (10/ 28).

Feltforsøk 4

Figur 5. Figuren viser resultat av kontingensanalyse i forsøk 4. Følgende kategorier er benyttet: 0 bendelorm = 1 (rødt), 1 bendelorm = 2 (grønt), 2 – 4 bendelorm = 3 (blått) og 5 eller flere = 4 (brunt). Gruppene er kodet iht tabell 1 og 8.



Resultatet viser at praziquantel utføret i anlegget (P9) har best effekt. I denne gruppen er det 25 av totalt 30 fisk uten bendelorm (25/ 30). Praziquantel utføret i forsøksmerden har også god effekt (34/ 50), mens oxibendazol utføret i forsøksmerden (OB4) har liten effekt (22/ 50). I kontrollgruppen er det en prevalens på 68 %, dvs 16 fisk uten bendelorm (16/50)

6.4. Effekt av piperonylbutoxid (PBO)

I feltforsøk 3 ble det tilsatt 30 mg piperonolbutoksid (PBO) pr kg fisk til grupper som fikk 75% praziquantel (P7) og 50% fenbendazol (F3) for å undersøke effekten av å hemme mulige detoxifiserende enzymer. Resultatet viste en svak effekt av PBO, størst for (F3), se figur 4. Dette ble undersøkt statistisk (JMP 7) med median test og Wilcoxon/ Kruskal-Wallis. Forskjellen var ikke signifikant ($P > \text{ChiSq}$ var henholdsvis 0.8250 og 0.7348).

6.5. "Dropouts"

Antall fisk i hver gruppe varierte noe ved avslutning. Det ble funnet 2 døde under feltforsøk 1. Gruppetilhørigheten til disse kunne ikke bestemmes. Det ble ikke registrert døde under feltforsøk 2. Minimerden forsøkene ble utført i, var montert inne i en annen merd med fisk. Dette gjorde at det ikke ble spent nett over minimerden, fordi fisk som hoppet i hovedmerden kunne dermed lande oppå nettet og bli liggende. Ved avslutning ble det funnet en del fisk uten merking i forsøksmerden. Denne har hoppet over fra hovedmerden. Det er sannsynlig at fisk også har hoppet fra forsøksmerden over i hovedmerden. Dette representerer ikke noe svakhet i materialet fordi prevalens av bendelorm var relativt høy. I feltforsøk 3 var det en del intubert fisk som ikke ble funnet igjen ved avslutning. Det ble registrert en del døde etter intubering. Årsaken kan være for hard bedøvelse kombinert med at det ble diagnostisert HSMB (Hjerte- og SkjelletMuskel Betennelse) på anlegget.

6.6. Resultater fra bioassay

Resultater fra bioassay er vist i tabell 6.

Tabell 11. Resultater fra bioassay med praziquantel i 2007 og 2008, bendelorm (*Eubothrium* sp.), evaluert etter 12 timer eksponering

Konsentrasjon	2007 Respons (totalt / døde)						2008 Respons (totalt / døde)	
	12. juni *		19. sept.**		2. okt**	18.okt**	8. april†	23.sept††
	Hele	Biter	Hele	Biter	Hele	Hele	Hele	Hele
0 (kontr.)	4 / 0	8 / 3	10 / 0	9 / 0	8 / 2	8 / 0	14 / 1	9 / 0
0.1	6 / 2	8 / 5	10 / 6	8 / 7	6 / 6	8 / 4	14 / 8	7 / 5
1.0 ppm	4 / 0	8 / 7	8 / 8	8 / 7	6 / 6	8 / 8	15 / 12	7 / 5
10 ppm	4 / 4	6 / 6	13 / 13	8 / 6	7 / 7	8 / 7	15 / 14	7 / 6
100 ppm	4 / 4	6 / 6	12 / 12	10 / 10	6 / 6	8 / 8	13 / 13	7 / 7
LD ₅₀ (ppm)	0.98	0.18	0.093	0.00	-	0.05	0.083 (0–0.4)	0.015

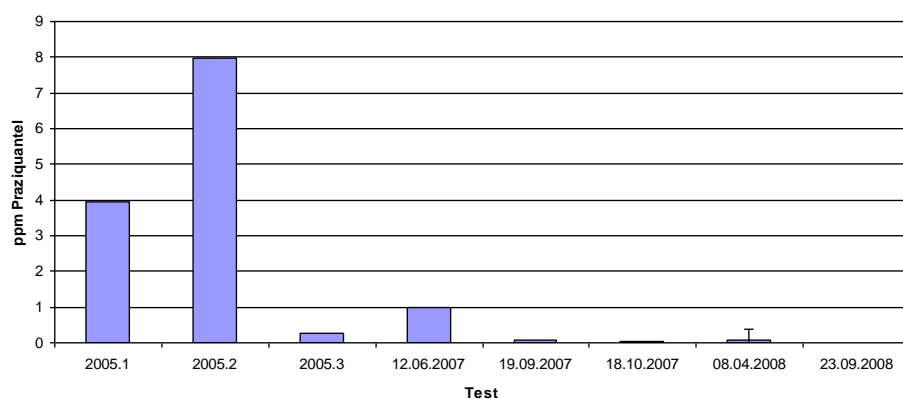
* Bendelorm innsamlet på Varakjelen, Varaldsøy

** Bendelorm innsamlet på Langavika, Hjelmeland

† Bendelorm innsamlet på Lindvik, Vindafjord

†† Bendelorm innsamlet på Fosså, Hjelmeland

Figur 6. Resultat fra bioassay med praziquantel og bendelorm (*Eubothrium* sp.) som LD₅₀ (LD₅₀ = konsentrasjon (ppm) som tar livet av 50 %). 2005.1 og 2005.2 – Marine Harvest, Aakre Varaldsøy. 2005.3 – Marine Harvest Syltøy Sotra. 12.06.07 – Marine Harvest Varakjelen Varaldsøy, 19.09.07 og 18.10.07 – Marine Harvest CAC Langavika, 08.04.2008 – Marine Harvest Lindvik Vindafjord, 23.09.08 – Marine Harvest Fosså, Hjelmeland



7. Diskusjon

7.1. Effekt av bendelorm på fiskens vekt

Generelt er reduksjon i vekt korrelert med økt antall bendelorm, og det er i samtlige tilfeller en reduksjon i vekt fra 0 bendelorm til 1 bendelorm (tabell 7). Denne forskjellen er imidlertid liten, og ikke signifikant ($p < 0.05$). Som nevnt innledningsvis har andre forfattere funnet redusert vekst og høyere forfaktor i fisk infisert med bendelorm (Bristow & Berland 1991, Saksvik 1998, Sundnes 2003). I flere av forsøkene i denne studien ble det registrert at den minste fisken ofte var mye kraftigere infisert enn større fisk. Fisken får i seg bendelorm ved å innta krepsdyr (copepoder ? - plankton) med *procercoid* stadiet, enten ved å spise krepsdyret eller drikke sjøvann med plankton. Det er mulig at den minste fisken spiser disse krepsdyrene mer aktivt enn større fisk. Fisken kan være så liten at føret blir for stort, eller de er typiske tapere som ikke slipper til under føring, og søker aktivt andre matkilder. Dette betyr at lav vekt ikke nødvendigvis skyldes et stort antall bendelorm i tarmen, men de har fått mye

bendelorm fordi de får i seg flere av mellomverteene, samtidig som de har lav vekst pga lite opptak av fôr.

Det er kun benyttet kontrollgrupper til å vurdere effekter av bendelorm på fiskens vekt fordi disse gruppene ikke er behandlet. Ved behandling har fisken fått en dose iht vekt. Dette medførte at stor fisk (høy vekt) fikk mer medisin enn liten fisk, samtidig som liten fisk (lavere vekt) har en tendens til å ha flere bendelorm. Medisinering kan derfor forsterke forskjeller fordi stor fisk (-med færre bendelorm) får mer medisin, altså høyere dose pr bendelorm enn liten fisk.

7.2. Feltforsøk, vekt

Dersom antall bendelorm er høyt i fisken, kan disse utgjøre en signifikant del av fiskens vekt. Dersom bendelormen forsvinner etter behandling, kan det registreres en reduksjon i vekt dersom vekten måles umiddelbart. Når fisken veies 13 – 15 dager etter behandling vil trolig fiskens vektøkning veie opp for dette. Dersom behandlingen resulterer i nedsatt appetitt, vil det kunne registreres bieffekt i form av redusert vekst i forhold til kontrollgruppen.

I feltforsøk 1 og 2 var det en vektøkning i gruppene med unntak av oxibendazol og albendazol. Dette kan indikere negative bieffekter av oxibendazol og albendazol. I feltforsøk 3 var det vektreduksjon i de fleste gruppene. På dette anlegget var det HSMB (Hjerte- og SkjelletMuskel Betennelse), noe som kan være årsaken til dårlig vekst i dette forsøket. Forsøksperiodene er korte i dette prosjektet, 13 dager (feltforsøk 1), 15 dager (feltforsøk 2), 14 dager (feltforsøk 3) og 7 dager (feltforsøk 4). Det er effekt av medisinering på antall bendelorm som er den viktigste forsøksparameteren. Det er derfor viktig å avslutte før eventuell reinfeksjon. Anleggene der forsøkene er utført vil også ha så kort periode med ”unormal” drift av merdene som mulig. Den korte forsøksperioden gjør at vekt som indikator på bieffekter er usikker.

7.3. Feltforsøk, antall bendelorm etter behandling

Det ble ikke registrert oppgulping av pellet etter behandling hos en eneste fisk. Fisken ble oppbevart i et stort hvitt kar til den svømte normalt og reagerte med frykt på bevegelser ved karet. Dette er imidlertid ingen garanti for at fisken ikke gulper på et senere tidspunkt. Noe av de varierende resultatene kan skyldes dette. Eksempelvis ble det funnet 5 bendelorm i en fisk som ble intubert fenbendazol. Fenbendazol har tidligere vist god effekt (pilotstudien i 2005). I gruppen som fikk albendazol ble det funnet en fisk som hadde 11 bendelorm, og en annen som hadde 7. Resultatene viser at albendazol hadde en viss effekt, så årsaken til dette kan være oppgulping av medisineret fôr.

I gruppen som ble intubert 150 % praziquantel i feltforsøk 1 og 2, ble det funnet fisk med maksimalt 2 bendelorm. I feltforsøk 2, ble det funnet fisk med 3 og 4 bendelorm i gruppen som ble intubert 75% praziquantel. Imidlertid hadde 75% dose praziquantel god effekt, men det er mulig at dosen ikke var stor nok til å fjerne samtlige dersom det var mange bendelorm i fisken.

Det er mulig at bendelorm under ugunstige forhold kan kvitte seg med proglotittene, slik at kun *scolex* sitter igjen innerst i pylorus blindsekkene. Dette kalles ”destrobilasjon” (Dr. Egil Karlsbakk, pers. med.). Størrelsen på *scolex* er ca 0.2 – 0.5 mm, avhengig av alder. Det er ikke mulig å finne ut om dette skjer eller ikke, med metoden som er benyttet her til å

registrere antall bendelorm. Destrobilasjon har imidlertid ikke blitt observert i noen av bioassayene som er utført.

7.4. Effekter av PBO

En mulig resistensmekanisme kan være økt metabolsk detoxifisering gjennom økt aktivitet av cytokrom P450 monooxygenaser. Resultatet viste en svak effekt av PBO, størst for (F3), se figur 4. Forskjellen var ikke signifikant. Bendelormen som ble testet var imidlertid følsom (- ikke resistent) for praziquantel og fenbendazol. Dette ble demonstrert både ved intubering i forsøk 3 (figur 4) og ved medisinerings av anlegget. Økt enzymaktivitet kan derfor ikke utelukkes som resistensmekanisme. Det er viktig å få gjennomført forsøk med PBO på anlegg med resistens mot praziquantel for å finne ut av dette.

7.5. Bioassay

Testing av biter ga varierende resultat, men det ser ut til å være mer følsomt enn hele bendelorm (tabell 6). Et bioassay må utføres med individer av god kvalitet, dvs individer med normal atferd etc. Sikreste måten å kvalitetssikre testen på, er derfor å teste individer med *scolex*.

Bendelorm i anlegget til Marine Harvest Varakjelen ved Varaldsøy er ikke tidligere behandlet med praziquantel. Imidlertid vurderes bendelormen i området som mindre følsom, fordi et naboanlegg behandlet med dårlig resultat (Vet. Randi Haldorsen, pers. med). Resultatet fra bioassayet viser at dette anlegget har bendelorm som er mindre følsom enn bendelormen ved CAC Langavika. Tidligere utført bioassay med resistent bendelorm har vist at testen viser det samme som intubering; liten effekt av praziquantel (FHF 2005). Denne testen ble imidlertid utført med hele lange bendelorm og ikke 7 cm lange biter (inkl. scolex) som testen ved CAC Langavika.

Bioassayet utført 2. oktober ble utført på bendelorm som hadde ligget lenger i saltløsning enn 1 – 3 timer. Disse hadde ligget 5 – 7 timer, og kan ha vært svekket som en følge av dette. Testen utført 18. oktober ble utført med medisinsk fysiologisk saltvann (Ecotainer® NaCl 0,9% B. Braun, Melsungen AG, Tyskland). Denne testen ga samme resultat som tidligere tester. Tidligere er det benyttet sjøvann tilsatt ferskvann til 0,9 % NaCl. Sjøvann varierer i kvalitet, dvs inneholder mange stoffer og forbindelser som kan ha betydning for effekt ved å binde kjemiske forbindelser.

Det er viktig å gjennomføre flere bioassay med resistent bendelorm når dette er mulig. I denne forsøksperioden ble det gjennomført kun et bioassay med resistent bendelorm (MHN Varakjelen). På dette anlegget var det ikke mulig å gjennomføre intubering eller behandling pga stor fisk og PD utbrudd våren 2007.

9. Konklusjoner

I dette prosjektet ble det ikke funnet et godt alternativ til praziquantel. Oxibendazol har effekt, men har samme type bieffekt som fenbendazol; nedsatt appetitt under og etter behandling. Ved behandlingssvikt med praziquantel er det derfor ikke mulig å benytte andre midler enn fenbendazol. I prosjektperioden (2007 – 2008) var det imidlertid få problemer med resistens mot praziquantel. Et bioassay for måling av følsomhet for praziquantel er utviklet og standardisert. Dette bioassayet bør evalueres med resistente populasjoner når dette er mulig.

10. Referanser

Bristow G A, Berland B (1991) The effect of long term, low level *Eubothrium* sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) infection on growth in farmed salmon (*Salmo salar* L.) Aquaculture **98**:325-330.

FHF (2005) Bendelorm (*Eubothrium* sp) hos laks (*Salmo salar*): Utprøving av nye behandlingsmidler og utvikling av et *in vitro* bioassay for måling av resistens overfor praziquantel, www.fiskerifond.no/files/projects/attach/551024.pdf

Saksvik M (1998) Life cycle and growth of *Eubothrium* sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) and effect on the host, Atlantic salmon (*Salmo salar*). Thesis for the degree of Candidatus scientiarum, University of Bergen.

Saksvik M, Nylund A, Nilsen F, Hodneland K (2001) Experimental infection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with marine *Eubothrium* sp (Cestoda: Pseudophyllidea): observations on the life cycle, aspects of development and growth of the parasite. Folia Parasitol (Praha) **48**(2):118-126.

Sevatdal S and Horsberg T E (2003) Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) against the pyrethroid deltamethrin using bioassays and probit modelling. Aquaculture. **218**, 21 – 21.

Sevatdal S, Copley L, Wallace C, Jackson D and Horsberg T E (2005) Monitoring the sensitivity of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) to the pyrethroids deltamethrin and cypermethrin in Norway, Ireland and Scotland using bioassays, and probit modelling. Aquaculture. **244**, 19 - 27.

Sundnes G (2003) Cestodes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at a W Norwegian hatchery: infection dynamics, aspects of development and pathology. Thesis for the degree of Candidatus scientiarum, University of Bergen.