



COPYRIGHT ©

Rapport: Bioassay bendelmark
side 1 av 16
1803 (VESO)

VESO Oslo

Validering av bioassay med praziquantel og bendelmark (*Eubothrium* sp.)

Rapport FHF-prosjekt 900988

Versjon 3.31.12.2014

VESO Oslo

Oppdrag 1803

G:\Arkiv\Protocol\Rapport.1803.31.12.2014

Versjon: 3

www.veso.no

Tittel: Validering av bioassay med praziquantel og bendelmark (<i>Eubothrium</i> sp.)	
Forfatter: Sigmund Sevatdal, PhD	
Utarbeidet av: VESOs hovedkontor, Oslo	Oppdragsgiver: FHF
Prosjektnummer: 1803	Oppdragsgivers referanse: 900988
Prosjektleder: Sigmund Sevatdal	Kontaktperson: Merete Bjørgan Schrøder

Dato: 6.november 2014	Tilgjengelighet/ISBN:
Antall sider: 15	Antall vedlegg: 2
Stikkord: Bendelmark, <i>Eubothrium</i> sp., resistens, bioassay	
Engelsk sammendrag: A bioassay for measuring sensibility to praziquantel is developed, standardized and validated. A single-dose (+ control group) bioassay is recommended when the number of individuals are below 10 per concentration in the validated test with 6 doses.	
Norsk sammendrag: Et bioassay for måling av følsomhet for praziquantel er utviklet, standardisert og validert. Et en-dose (+ kontrollgruppe) bioassay er anbefalt når antallet individer er lavere enn 10 per konsentrasjon i den validerte testen med 6 doser.	
VESO, Ullevålsvn 68, postboks 300 Sentrum, 0103 Oslo, Tlf. 2296 1100, Fax 2296 1101	

Innhold

Sammendrag	4	Feltkode endret
Abstract (english).....	4	Feltkode endret
Tittel	4	Feltkode endret
Bakgrunn	4	Feltkode endret
Studien er gjennomført av:	5	Feltkode endret
Innledning	5	Feltkode endret
Hovedmålene i denne studien har vært:	6	Feltkode endret
Materiale og metode.....	6	Feltkode endret
Tidligere studier	6	Feltkode endret
Studier i 2014	6	Feltkode endret
Intubasjon.....	7	Feltkode endret
Utregninger:	7	Feltkode endret
Doser med Piperonylbutoksid (PBO) og fenbendazol	7	Feltkode endret
Evaluerer av antall bendelmark i mageprøver	7	Feltkode endret
Utvikling av bioassay	8	Feltkode endret
Innsamling av bendelorm	8	Feltkode endret
Gjennomføring av tester	8	Feltkode endret
Tidligere tester	8	Feltkode endret
Tester i 2014	8	Feltkode endret
Fortynning og gjennomføring.....	8	Feltkode endret
Statistikk	9	Feltkode endret
Resultater	9	Feltkode endret
Resultater fra intubering og medisinerer	9	Feltkode endret
Resultater av intubering med PBO.....	9	Feltkode endret
Resultat av intubering med fenbendazol	9	Feltkode endret
Validering av bioassay	10	Feltkode endret
Grenseverdier for definisjon av resistens	11	Feltkode endret
Definisjon av resistens.....	11	Feltkode endret
Forslag til grenseverdi.	12	Feltkode endret
Diskusjon	12	Feltkode endret
Konklusjon	13	Feltkode endret
Referanser	13	Feltkode endret

Sammendrag

Et bioassay med bendelmark (*Eubothrium* sp.) for måling av følsomhet mot legemidlet praziquantel er utviklet og validert. Utvikling og validering er gjennomført ved å behandle fisk med anbefalt dose ved intubasjon, og sammenligne effekten med resultat fra en *in vitro* test (bioassay) med innsamlede bendelmark fra samme populasjon (lokalitet). Det er utført totalt 10 tester (2005: 3, 2007: 2, 2008: 2, 2014: 3). I den validerte testen benyttes 6 konsentrasjon praziquantel (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 og 100 ppm). Eksponeringstiden er 12 timer ved 12 °C. Ved evaluering klassifiseres bendelmarken som død eller levende på grunnlag av bevegelse. Resultatet benyttes til å estimere LC₅₀ konsentrasjon av praziquantel (LC₅₀ - «Lethal Concentration» - som dreper 50 % av individene i testen). Følsom: LC₅₀ < 1.0 ppm, Resistent: LC₅₀ > 1.0 ppm. Resultatet fra prosjektet er også benyttet til å utvikle en forenklet test (en-dose bioassay) med kun kontroll gruppe og en konsentrasjon (1.0 ppm), til å skille mellom følsom og resistent bendelmark. Eksponeringstiden er 12 timer ved 12 °C. Følsom: > 70 % dødelighet, resistent: < 70 % dødelighet. Begge testene forkastes dersom det er ≥ 20 % døde i kontrollgruppen. Et en-dose bioassay bør benyttes dersom antallet bendelmark til testing er < 60 individer, dvs mindre enn 10 i hver konsentrasjon når 6 konsentrasjoner benyttes.

Abstract (english)

A bioassay with tapeworm (*Eubothrium* sp.) for measuring sensitivity to the medical substance praziquantel is developed and validated. Development and validation is performed by treating fish with the recommended dose by intubation and compare the effect with results from an *in vitro* test (bioassay) with tapeworms collected from the same population (locality). A total of 10 tests have been performed (2005: 3, 2007: 2, 2008: 2, 2014: 3). The validated test uses 6 concentrations of praziquantel (0, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 and 100 ppm). The exposure time is 12 hours at 12 °C. The tapeworm is classified during evaluation as dead or alive on the basis of movement. The result is used to estimate LC₅₀ concentration of praziquantel (LC₅₀ - "Lethal Concentration" - which kills 50% of the individuals in the test). Sensitive: LC₅₀ < 1.0 ppm, Resistant: LC₅₀ > 1.0 ppm. The result of the project is also being used to develop a simplified test (one-dose bioassays) with only control group and one concentration (1.0 ppm), to distinguish between sensitive and resistant tapeworm. The exposure period is 12 hours at 12 °C. Sensitive: > 70% mortality, resistant: < 70% mortality. Both tests are discarded if ≥ 20% died in the control group. A one-dose bioassays should be used if the number of tapeworms is < 60 individuals, i.e. less than 10 in each concentration when 6 concentrations used.

Tittel

Validering av bioassay med praziquantel og bendelmark¹ (*Eubothrium* sp)

Bakgrunn

Det er tidligere utført to prosjekter med bendelmark i regi av FHF;
2005: Pilotprosjekt; Bendelorm *Eubothrium* sp. hos laks (*Salmo salar*), FHF prosjektnummer 551024.
2007 – 2008: Resistens hos bendelorm (*Eubothrium* sp.), FHF prosjektnummer 552024.

¹ Benevnelsen bendelmark er valgt i stedet for bendelorm. Begge benyttes, men bendelmark er valgt fordi «-orm» gir, etter forfatterens mening, en feil beskrivelse

Målene med prosjektene var å undersøke effekten av alternative legemidler til behandling av laks med bendelmark og å utvikle et *in vitro* bioassay for testing av følsomheten til bendelmarken mot praziquantel. I 2008 ble det gjennomført flere bioassay som ble validert med bendelmark med høy følsomhet mot legemiddelet. Det ble ikke testet mot resistente populasjoner med bendelmark fordi bendelmarken var følsom i de lokalitetene som var tilgjengelige.

Etter 2008 ble det utført svært få behandlinger mot bendelmark. I 2012 ble det behandlet mot bendelmark igjen i enkelte områder. Redusert behandlingseffekt ble registrert i 2013. Dette medførte økt behov for å måle følsomhet før behandling. VESO ble kontaktet av FHF for å fullføre arbeidet med et bioassay ved å validere testen med 2 resistente populasjoner med bendelmark.

Studien er gjennomført av:

Finansiert av: Fiskeri – og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF)
Postboks 1214 Sluppen
7462 Trondheim
Email: merete.schroder@fhf.no

Styringsgruppe: Veterinær Per Helge Bergtun
Marine Harvest Norge
Email: per.helge.bergtun@marineharvest.com

Veterinær Kari Lillesund
Alsaker Fjordbruk
Email: kari.lillesund@fjordbruk.no

Veterinær Olav Breck (varamann for Per Helge Bergtun)
Marine Harvest Norge
Email: Olav.Breck@marineharvest.com

Øvrig personell: Veterinær Anna Lena Kleppa
Marine Harvest Norge
Email: anna.lena.kleppa@marineharvest.com

Prosjektleder: Sigmund, Sevatdal, PhD.
VESO
Postboks 300, Sentrum
0103 Oslo
Telefon: 90 60 37 85
Email: ssevatda@online.no / sigmund.sevatdal@veso.no

Innledning

Bendelmark; *Eubothrium* sp. hos laks tilhører phylum; *Platyhelminthes* (flatmarker), subklasse *Eucestoda* og overfamilie *Pseudophyllidea*. Den finnes både i ferskvann og i saltvann. Ferskvannsformen benevnes som *Eubothrium crassum*, mens saltvannsformen benevnes foreløpig som *Eubothrium* sp. (Saksvik et al. 2001). Analyse av allozymer indikerer genetisk forskjell mellom ferskvann og saltvann (Berland og Bristow 1989).

Bendelmark består av en hodedel (scolex) med et festeapparat, og en segmentdel (strobila) der hvert segment (proglottid) har både hannlige og hunnlige kjønnsorganer. Bendelormer er derfor hermafroditiske, og både seksuell og aseksuell formering er mulig. Bendelormer mangler munn og tarmsystem, men tar næringsstoffer direkte opp gjennom kroppsoverflaten. 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.

Bendelmark blir i dag behandlet med legemiddelet praziquantel (prazinoisoquinolin). Denne substansen er markedsført under preparatnavnet Droncit vet. til hund, katt og hest. Til laks benyttes en formulering i form av medisinpellets produsert av et fôrfirma (Ewos eller Skretting AS).

PiperonylButOksyd (PBO) ble benyttet sammen med praziquantel i intubasjonsforsøket ved Skiftesvik, Hjelmeland for å undersøke om dette hadde kunne forbedre effekten til praziquantel. PBO hemmer cytokrom P450-oksigenaser, som katalyserer oksidativ detoksifisering av giftstoffer. Dersom PBO har effekt betyr det at oksidativ detoksifisering er en mulig resistensmekanisme.

Fenbendazol (Panacur, MSD Animal Health) er brukt tidligere i begrenset grad, men dette legemiddelet medfører nedsatt appetitt etter behandling (FHF 2005). Det er ikke anbefalt å behandle med fenbendazol når sjøtemperaturen er under 10 °C. Fenbendazol ble benyttet i intubasjonsforsøket ved Flatholmen, Røvær til behandling av en positiv kontrollgruppe, for å kontrollere at metoden med intubasjon av legemiddel fungerer.

Hovedmålene i denne studien har vært:

Fullføre utviklingen av et bioassay med praziquantel og bendelmark (*Eubothrium* sp.) ved å validere testen med 2 resistente populasjoner. Dette er gjort ved å sammenligne resultater fra bioassay med behandlingseffekt etter intubasjon med anbefalt dose praziquantel (10 mg/kg) av laks med resistant bendelmark.

Materiale og metode

Tidligere studier

Tidligere utførte forsøk med bioassay og bendelmark ble utført i perioden 2005 – 2008 og er beskrevet i tabell 5. Disse forsøkene er tidligere rapportert: Sluttrapport: Resistens hos bendelorm (<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=552024>). Fisken ble blekkmerket i samtlige forsøk og holdt i samme minimerd i det aktuelle anlegget. Antall bendelmark ble evaluert 1 – 2 uker etter intubasjon.

Feltkode endret

Studier i 2014

Den første studien i 2014 ble gjennomført ved Marine Harvest lok. Skiftesvik, Hjelmeland. Bioassayet ble gjennomført 2 ganger, første gang ved intubasjon (18.03.14) og andre gang ved avslutning av forsøket en uke senere (26.03.14). Ved avslutning ble bendelmark hentet fra kontrollgruppen. Den andre studien ble utført ved Alsaker Fjordbruk, lokalitet Flatholmen, Røvær i Haugesund kommune. Intubasjon ble utført 3.7.14, og avsluttet en uke senere (10.7.14). Det ble samlet inn mager fra ca 45 fisk ved intubasjon for å gjennomføre et bioassay, men det ga totalt kun 17 bendelmark. Siden

kontrollgruppen kun inneholdt 20 fisk, og dermed ingen sannsynlighet for få parasitter til å utføre en test, ble det ikke forsøkt ved avslutning av forsøket.

Intubasjon

Forsøkene ble gjennomført etter samme prinsipp som beskrevet i rapporten; Sluttrapport: Resistens hos bendelorm (<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=552024>. I forsøkene som ble utført i 2014 ble intubert mengde ble ikke beregnet individuelt for hver fisk, men etter gjennomsnittsvekt. Fisk som avvek tydelig mhp størrelse ble ikke tatt med i studiene.). Fisken ble intubert doser i henhold til tabell 1. I alle forsøk ble det intubert en enkelt dose (100 % dose = 10 mg/kg).

Gjennomsnittsvekt ble bestemt i forkant av mannskapene på anleggene. Fisken i de ulike gruppene ble merket med blekkmerking iht tabell 1. Det ble veid 10 pellet fra begge fôrtyper. Vekten var 0.11 g pr pellet ved Skiftesvik og 0.15 g pr pellet ved Flatholmen . Gjennomsnittsvekt på fisk og intubert mengde er også vist i tabell 1.

Feltkode endret

Tabell 1. Grupper og intubasjon

Lokalitet	Behandling	Merket	Antall	Vekt(kg)	Intubert
Skiftesvik	Kontroll	1-2	20	0.8	0
	100% Praziquantel	2-4	20		8 mg (18 pellet)
	200% Praziquantel	1-3	20		16 mg
	100% praz. + PBO	1-4	20		8 mg
Flatholmen	Kontroll	2-4	20	1.2	0 mg
	100% Praziquantel	1-2	20		12 mg (20 pellet)
	200% Praziquantel	1-3	20		24 mg
	100% Fenbendazol	1-4	20		12 mg

Utrekninger:

Skiftesvik (100 % dose – 10 mg/ kg):

Antall pellet i 100 g fôr: $100 \text{ g} \div 0.11 \text{ g} = 909.1$

Antall mg substans pr pellet: 100 g fôr er tilsatt 400 mg aktiv substans: $400 \text{ mg} \div 909.1 = 0.44 \text{ mg}$

Flatholmen (100 % dose – 10 mg/ kg):

Antall pellet i 100 g fôr: $100 \text{ g} \div 0.15 \text{ g} = 666.7$

Antall mg substans pr pellet: 100 g fôr er tilsatt 400 mg aktiv substans: $400 \text{ mg} \div 666.7 = 0.6 \text{ mg}$.

Ved intubasjon av 200% ble 100 gram fôr tilført 800 mg aktiv substans.

Doser med Piperonylbutoksid (PBO) og fenbendazol

Det ble tilsatt 30 mg PBO pr kg fisk: 0.6 ml PBO til 100 gram fôr (1.38 mg pr pellet). Dosen med Fenbendazol ble beregnet på samme måte som dosen med praziquantel; 100 % dose, dvs 10 mg/kg.

Evaluering av antall bendelmark i mageprøver

Laksen ble avlivet med en overdose benzocain eller med slag i hodet. Deretter ble gruppetilhørighet bestemt. Mage-pylorus-tarm ble tatt ut og fryst ned før senere registrering av bendelmark. Ved bestemmelse av antall bendelmark ble mage-pylorus-tarm klippet opp på langs. Innholdet ble deretter presset ut i en bolle med vann, inkludert innholdet i samtlige blindsekker. Bendelmarken

sank til bunnen mens det øvrige tarminnholdet fløyt i vannet. Innholdet ble vasket ved å skifte vann flere ganger. Antallet bendelmark ble registrert ved å telle "hoder" (scolex) eller avsmalende strobila der scolex manglet. Kontrollgruppen var en egen gruppe som ble intubert før uten praziquantel.

Utvikling av bioassay

Tidligere utførte forsøk med bioassay og bendelmark ble utført i perioden 2005 – 2008 og er beskrevet i tabell 5. Disse forsøkene er tidligere rapportert: Sluttrapport: Resistens hos bendelmark (<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=552024>).

Feltkode endret

Innsamling av bendelorm

Oppklippede mage/tarmpakker ble lagt i fysiologisk saltvann (Ecotainer® NaCl 0,9% B. Braun, Melsungen AG, Tyskland) i 1 – 3 timer. Deretter ble bendelmark som hadde løsnet av seg selv samlet inn. Bendelmark ble også fjernet manuelt fra pylorus ved å klemme ut innholdet samtidig som parasitten ble dradd ut forsiktig med en pinsett.

Gjennomføring av tester

Tidligere tester

Det ble gjennomført i alt 7 bioassay med praziquantel. De to første testene ble utført med bendelmark samlet inn ved Marine Harvest Varakjelen ved Varaldsøy i Hardanger. Det ble også gjennomført 3 tester med følsom bendelmark 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. Testene er beskrevet i rapporten fra 2008 (FHF 2008); Sluttrapport: Resistens hos bendelorm (<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=552024>).

Feltkode endret

Tester i 2014

I 2014 ble det utført bioassay med bendelmark samlet inn ved Marine Harvest lokalitet Skiftesvik ved Hjelmeland, ved intubasjon 18.03.14 og ved avslutning og evaluering 26.03.14.

Det ble også samlet inn bendelmark fra Alsaker lokalitet Flatholmen ved Røvær. Det ble kun samlet inn 17 bendelmark, men de ble benyttet i et bioassay med 5 doser + kontrollgruppe.

Fortynning og gjennomføring

Praziquantel løses dårlig i vann, men godt i etanol. Stamsløsningen 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 3. Testene ble utført med medisinsk fysiologisk saltvann (Ecotainer® NaCl 0,9% B. Braun, Melsungen AG, Tyskland).

Grupper av bendelmark ble eksponert i polystyren prøveglass med skrukork. Ved evaluering ble bendelmark og noe av eksponeringsvæsken overført til en petriskål. Bevegelse ble brukt som indikasjon på at bendelormen var levende. Individuer uten bevegelse, selv etter berøring, ble klassifisert som døde.

Tabell 2. Fortynning av praziquantel til bruk i bioassay med *Eubothrium* sp.

Løsning (konsentrasjon)	Fys.saltvann (ml)	Eksponeringsløsn. Konsentrasjon
0.5 ml stamløsning	+ 49.5 *	100 mg/ l (100 ppm)
5 ml 100 ppm løsn.	+ 45	10 mg/ l (10 ppm)
5 ml 10 ppm løsn.	+ 45	1 mg/ l (1 ppm / 1000 ppb)
5 ml 1 ppm løsn.	+ 45	0.1 mg/ l (100 ppb)
5 ml 0.1 ppm løsn	+ 45	0.01 mg/ (10 ppb)
Kontroll	50 ml	0

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

Testene ble utført ved 12 °C.

Statistikk

Følsomheten til bendelorm i bioassay ble registrert som LC₅₀, den konsentrasjonen (ppm) praziquantel som dreper 50 % av individene. Estimering av LC₅₀ er utført med probit analyse (POLO, LeOra Software, Menlo Park, California), og JMP 10.0 (SAS Institute).

Resultater

Resultater fra intubering og medisinerings

Tabell 3. Resultater fra intubering i 2014

Lokalitet	Effekt pr behandlingsregime*									
	Kontroll		Praziquantel 100 %		Praziquantel 200 %		Praziquantel 100 % + PBO		Fenbendazol 100 %	
	Snitt	Effekt	Snitt	Effekt	Snitt	Effekt	Snitt	Effekt	Snitt	Effekt
MHN	6.75	-	2.25	59.26	1.45	78.25	2.45	63.7	-	-
Alsaker	0.3		0.3	0	0.2	33.33	-	-	0.05	83.3

* Effekt er regnet ut som: 100 – Gj.snitt etter behandling/Gj. Snitt i kontroll* 100

Resultater av intubering med PBO

Tilsetning av PBO bidro ikke til å øke effekten av praziquantel (tabell 4).

Resultat av intubering med fenbendazol

Intubering med fenbendazol resulterte i en effekt på 83.3 % (tabell 4).

Validering av bioassay

Tabell 4. Effekt av behandling med praziquantel og LC₅₀ verdier fra bioassay

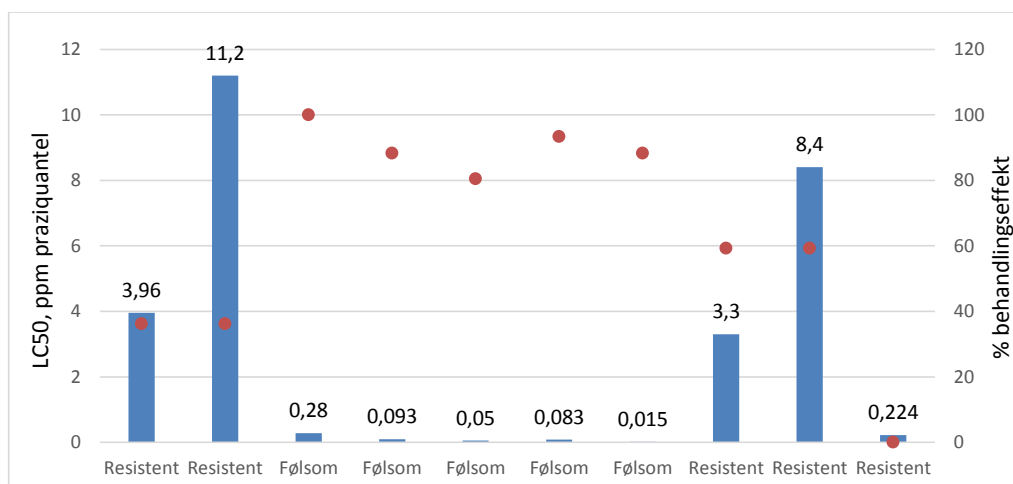
Dato Lokalitet	Dose	Verifisert effekt		Resultat av bioassay – LC ₅₀ (ppm praziquantel)	Følsomhet
		Resultat - % effekt ¹	Reduksjon i prevalens ² - ³		
07.09.2005 Varaldsøy	100 %	36.2	3.5 %	3.96	Resistent
17.10.2005 Varaldsøy				7.99	Resistent
21.10.2005 Syltøy	100 %	100	100 %	0.28	Følsom
19.09.2007 Langavik	100 %	88.3	63.7 %	0.093	Følsom
18.10.2007 Langavik	100 %	80.4	48.2 %	0.05	Følsom
08.04.2008 Lindvik	100 %	93.3	79.3 %	0.08	Følsom
	150 %	77.8	42.4 %		
23.09.2008 Hjelmeland	100 %	88.3	52.9 %	0.015	Følsom
19.03.2014 Hjelmeland	100 %	59.2	0 %	3.3	Resistent
	200 %	78.2	15.8 %		
26.03.2014 Hjelmeland				8.4	Resistent
03.07.2014 Røvær	100 %	0	0 %	0.224	Resistent
	200 %	33.3	40 %		

¹ Effekt er regnet ut som: $100 - \text{Gj.snitt antall etter behandling} / \text{Gj. Snitt antall i kontroll} \times 100$

² Prevalens (Frekvens: % fisk med bendelmark): $\text{Antall fisk med bendelmark} / \text{Tot. Antall fisk} \times 100$

³ Effekt som reduksjon i prevalens: $100 - \text{Prevalens etter behandling} / \text{prevalens kontroll} \times 100$

Figur 1. Effekt av behandling med praziquantel som % behandlingseffekt (røde prikker) og LC₅₀ verdier fra bioassay (blå søyler).



Grenseverdier for definisjon av resistens

Tabell 5. Responndata ved de ulike konsentrasjonene samt % respons ved 1 ppm.

Lokalitet	Varaldsøy		Syltøy Sotra	Hjelmeland Langavik		Lindvik	Hjelmeland	Skiftesvik		Flat-holmen
Dato	7/9-05	17/10-05	21/10-05	19/9-07	18/10-07	8/4-08	23/9-08	19/3-14	26/3-14	3/7-14
Dose	Respons ratio (tot./død)									
0	5/0	5/0	6/0	10/0	8/0	14/1	9/0	15/0	10/0	3/0
0.01 ppm	-	-	-	-	-	-	-	18/3	11/0	2/0
0.1 ppm	7/0	8/1	8/2	10/6	8/4	14/8	7/5	15/2	11/1	3/2
1 ppm % respons	5/0 0	8/1 12.5	12/10 83.3	8/8 100	8/8 100	15/12 80	7/5 71.4	16/5 31.2	11/1 9.1	3/1 33.3
10 ppm	8/2	8/5	9/7	13/13	8/7	15/14	7/6	16/6	10/3	3/3
100 ppm	8/8	7/7	9/9	12/12	8/8	13/13	7/7	17/17	13/13	3/3
LC ₅₀	11.2	3.94	0.28	0.093	0.05	0.08	0.015	3.3	8.4	0.224
Behandl.effekt*	36.2 %		100 %	88.3 %	80.4 %	93.3 %	88.3 %	59.2 %		0

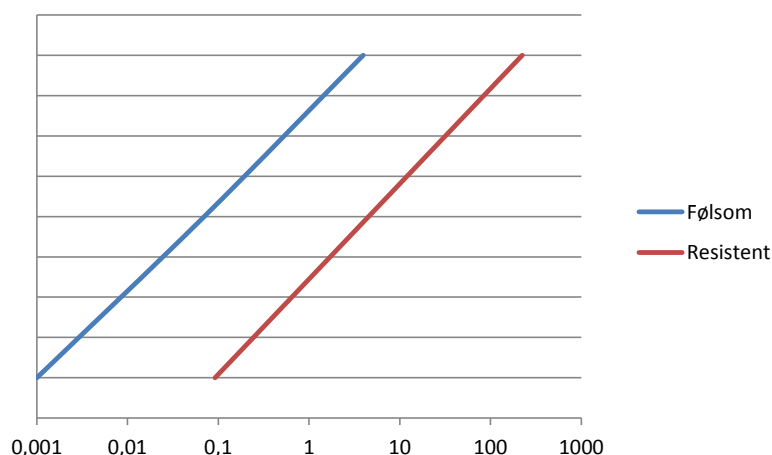
* Behandlingseffekt ved 100 % konsentrasjon (10 mg/ kg) er regnet ut som: 100 – Gj.snitt etter behandling/Gj. Snitt i kontroll* 100

Definisjon av resistens

De ulike populasjonene med bendelmark ble klassifisert i 2 grupper; følsom og resistent. Når behandlingseffekt var over 80 % ble populasjonen klassifisert som følsom, og som resistent når behandlingseffekt var lavere enn 80 %. Responsresultater for slått sammen for hver kategori og

behandlet med probit analyse. LC_{50} for følsomme bendelmark ble estimert til 0.07 ppm (95%konf.int: 0.013 – 0.176) og 4.54 ppm (1.5 – 17.38) for resistent.

Figur 2. Figuren viser probit linjer til følsom og resistent bendelmark. Følsom: $LC_{10} = 0.001$, $LC_{50} = 0.07$, $LC_{90} = 3.95$, Resistent: $LC_{10} = 0.092$, $LC_{50} = 4.54$, $LC_{90} = 223.77$)



Forslag til grenseverdi.

En effekt på 80 % reduksjon av antall bendelmark etter intubasjon ble benyttet som grenseverdi til å skille mellom følsomme og resistent bendelmark. LC_{80} ble regnet ut med probit analyse, og resultatet ble 0.989, dvs tilnærmet lik 1. Ved en gjennomgang av rådata (tabell 5) ser det også ut til at 1.0 ppm gir > 70 % effekt hos følsomme populasjoner og < 70 % effekt hos resistente populasjoner både ved behandling med 100 % dose ved intubasjon og som respons i bioassay.

Diskusjon

Eksponeringstiden det tar under en behandling i felt vil variere med fôringsregime. Det er anbefalt å dosere praziquantel over 2 dager, dvs 5 mg/ kg fisk pr dag. Dette betyr at behandlingsdosen ikke overstiger 5 mg/ kg (5 ppm). Ved å dosere over 2 dager, vil også flere fisk få i seg medisin, fordi all fisk ikke har like stor appetitt hver dag. Resultater fra innledende forsøk med bioassay viste at ved 24 timer var det dødelighet i kontrollgruppen. Derfor ble 12 timers eksponering valgt.

Resultat av intubasjon er vist som antall bendelmark pr fisk. Antall bendelmark er undersøkt og registrert så nøyaktig det lar seg gjøre. Evaluering av behandling i felt vil i praksis bli undersøkt som prevalens, dvs om fisken har bendelmark eller ikke. Reduksjon i frekvens etter behandling er vist i tabell 4, og viser at lav behandlingseffekt resulterer i liten endring i prevalens etter behandling. Følsomme populasjoner har en behandlingseffekt fra 78 – 100 %, og en reduksjon i prevalens fra 42 – 100 %.

LC_{50} verdien som ble estimert i testen fra Flatholmen i 2014 var 0.224 (Tabell 4 og 5). Denne verdien indikerer følsomhet, men det var ingen behandlingseffekt etter intubasjon. Det ble benyttet 17

individer fordelt på 6 konsentrasjoner. Konfidensintervallet (95%) var 0.2 – 10.2. Det var 33 % respons ved 1.0 ppm. Konfidensintervallet er stort og indikerer lav presisjon av estimering. Det er derfor sannsynlig at LC₅₀ verdien som er estimert ikke viser riktig resultat, fordi det er for få individer i testen. Ved så lavt antall individer vil en test med en dose (+ kontroll) gi større grad av sikkerhet mhp riktig resultat.

Det er utført bioassay av samme populasjon 2 ganger, Varaldsøy 205 og Skiftesvik 2014. resultatet viser en variasjon av LC₅₀ på henholdsvis 3.96 -7.99 ppm og 3.3 -8.4 ppm. Følsomhet oppgitt som LC₅₀ skal ikke betraktes som en «eksakt» verdi, fordi ved resistens øker variasjon mhp følsomhet i populasjonen og presisjonen er avhengig av konsentrasjonsskalaen som er benyttet i testen.

Fenbendazol ga god effekt, men dette middelet gir bieffekter i form av nedsatt appetitt i minst 2 uker og andre negative effekter som dannelse av sår og dødelighet ved lav temperatur (FHF 2005). Tilsetning av PBO sammen med praziquantel ga ingen økt effekt på resistent bendelmark. Dette indikerer at enzymatisk detoksifisering med mono-oxygenaser trolig ikke er involvert i resistensmekanismen.

Et bioassay med 6 konsentrasjoner (inkl. kontroll) er krevende og krever mye innsats og relativt mange parasitter for å gi et sikkert resultat i form av en estimert LC₅₀ verdi. Resultatene indikerer at det er en grenseverdi på ca 1.0 ppm (Kari Olli Helgesen og Tor Einar Horsberg, NMBU, pers. med.). Det er derfor foreslått i protokollen at et forenklet bioassay der det benyttes kun kontrollgruppe og 1.0 ppm konsentrasjon. Dersom respons er høyere enn 70 % i 1.0 ppm etter 12 timer, skal populasjonen kategoriseres som følsom og dersom den er lavere enn 70 % skal den kategoriseres som resistent. Dette bør valideres mot effekt etter behandling i felt. Det er derfor viktig at effekten av en feltbehandling undersøkes og sendes inn dersom det er utført en følsomhetstest før behandling.

Veterinærer og fiskehelsepersonell evaluerer kun prevalens, dvs om det finnes bendelmark i tarmen eller ikke etter behandling. Antall bendelmark i hver fisk registreres ikke. Det er en sammenheng mellom effekt (reduksjon i antall pr fisk) og reduksjon i prevalens (tabell 4).

Konklusjon

Et bioassay med 6 doser inkl. kontrollgruppe kan skille mellom følsomme og resistente populasjoner. Bioassayet er validert med behandlingsresultat etter intubering av fisk med anbefalt dose praziquantel.

Et forenklet bioassay med en dose (1.0 ppm praziquantel) + en kontrollgruppe bør benyttes dersom antallet bendelmark er mindre enn 10 i hver konsentrasjon.

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

Feltkode endret

FHF (2008) Resistens hos bendelorm (*Eubothrium* sp.) (<http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=552024>)

Feltkode endret

Helgesen K O and Horsberg T E (2013) Single-dose field bioassay for sensitivity testing in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*: development of a rapid diagnostic tool. *Journal of Fish Diseases*, 36(3): 261 – 272.

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 Parasitologica (Praha)* **48**(2):118-126.

Appendix 1

Seminar; Bioassay med bendelmark

Seminarret ble holdt i FoMAS lokaler i Haugesund 15. oktober 2014

Følgende personer deltok:

Anna Lena Kleppa, Marine Harvest

Eirik Hoel, Marine Harvest

Solveig Nygård, FoMAS

David Persson, FoMAS

Linda Andersen, ILAB

Sindre Grimen, ILAB

Margunn Sandstad, Skretting

Det ble samlet inn mager fra laks på Alsakers lokalitet Flatholmen, Røvær. Fisken ble åpnet, magene tatt ut, skylt og lagt i fysiologisk saltvann.

Kurset startet med en presentasjon om hva som skulle gjennomgås på seminarret, bendelmarken (art, livssyklus etc.), resultater fra tidligere prosjekter og resultater fra dette prosjektet, tolkning av resultater, spesielt mhp et «en-dose» bioassay. Deretter ble innsamling av bendelmark presentert før deltagerne samlet inn bendelmark fra laksemage. Det ble samlet inn totalt 28 bendelmark med scolex.

Det ble satt opp et bioassay der fortykning og eksponering ble demonstrert. Deretter spanderte VESO middag på Hotell Raddison. Etter middag, dvs ca kl 17:00 ble testen evaluert slik at deltagerne fikk demonstrert eksempler på død og levende bendelmark i en test.

Resultatet av testen viste høyere følsomhet enn forventet. Dette kan skyldes at parasittene ble håndtert mindre skånsomt og av flere personer, enn dersom testen hadde blitt utført av en erfaren person iht standard protokoll.

Deltagerne fikk også utlevert hvert sitt eksemplar av en standard protokoll for gjennomføring av bioassay med bendelmark og praziquantel.

Skretting v / Margunn Sandstad kan levere 0.5 g (500 mg) praziquantel for testing etter resept.

Konklusjon

Et bioassay med 5 konsentrasjoner + kontroll er verifisert med følsom og resistent bendelmark

Resultater fra bioassay som LC₅₀ har klar sammenheng med resultater fra intubasjon

Et forenklet bioassay med 1 konsentrasjon + kontroll er presentert.

Det er viktig at resultat fra bioassay sammenlignes med resultater fra feltbehandling.



COPYRIGHT ©

Rapport: Bioassay bendelmark
side 16 av 16
1803 (VESO)

Appendix 2

Standardprotokoll for gjennomføring av bioassay med bendelmark og praziquantel