

Faglig slutt-rapport

Genetisk resistens hos lakselus: Kartlegging av merdivariasjon i genetisk resistens

Prosjektnr: 901068

Peder A. Jansen

Sea Lice Research Centre

Universitetet i Bergen

Februar 2017

Sammendrag

Hovedmålet i prosjektet har vært å gi ny dokumentasjon og kunnskap om hvordan genetisk resistens i lakselus opptrer på anleggs- og merdnivå. Resistenstesting i prosjektet har omfattet molekylær påvisning av egenskaper knyttet til resistens mot azametifos, pyretroider og hydrogenperoksid. Prøver av lakselus er samlet inn fra ulike merder før og etter behandling med gitt lusemiddel. Samtidig er det samlet inn detaljert informasjon om behandlingene, samt data fra lusetellinger før og etter behandling. Behandling med azametifos medførte markert endring i resistensegenskapene hos lus før og etter behandling. Nært 100% av lus som var homozygot mottakelige for dette lusemiddelet var fraværende etter behandling, mens azametifos-spesifikk dødelighet ble beregnet til størrelsesorden 40 - 50% for heterozygote lus og 0 – 10% av homozygot resistente lus. Også for pyretroider var det en seleksjon mot økende resistens ved behandling. Forskjellene var imidlertid mindre tydelige enn for azametifos, men dette kan skyldes at det var utbredt resistens i alle prøvetatte merder også før behandling. For hydrogenperoksid var det ikke tydelige systematiske forskjeller i grad av katalaseuttrykk før og etter behandling. Fra forsøkene som fokuserte på merd- og vertsvariasjon i resistensegenskaper uten direkte tilknytning til noen behandlingsepisode, var det av underordnet betydning om lus stammet fra normale fisk eller såkalte svimere. Videre var det ikke av betydning hvilken merd lus ble samlet fra eller om de var samlet inn første eller andre uke. Disse undersøkelsene tyder på at et stort nok utvalg av lus fra en gitt merd vil være representativt for resistenssituasjonen i anlegget, gitt at merdene har noenlunde lik behandlingshistorikk.

Nytteverdien av prosjektet for oppdrettsnæringen kan oppsummeres med:

- Resultatene underbygger generelt en restriktiv strategi hva angår bruk av kjemiske midler i bekjempelsen av lakselus, både ved at behandlingene viste sterk selektiv kraft for resistensutvikling og ved at resistens mot organofosfater og pyretroider var utbredt.
- For organofosfater spesielt, viser resultatene at genetisk testing for resistensegenskaper i forkant av en eventuell behandling vil gi en god indikasjon på potensiell behandlingseffekt og en forutsigbar endring i genotype-sammensetning etter en behandling.
- Endelig sannsynliggjorde resultatene fra prosjektet at genetisk testing av et utvalg lus på en lokalitet vil være representativt for lusepopulasjonen på lokaliteten, uavhengig av hvilken merd eller vertsfisk utvalget innsamles fra.

1. Innledning

Hovedmålet i dette prosjektet har vært å gi ny dokumentasjon og kunnskap om hvordan genetisk resistens i lakselus mot ulike behandlingsmidler opptrer på anleggs- og merd nivå. Herunder, om eventuell variasjon i behandlingseffekt mellom merder reflekterer variasjon i resistensnivå, eller om det er andre forklaringsmodeller for slik variasjon. Det har også vært et mål å bedre forståelsen av hvordan avlusning virker på merd- og anleggsnivå med hensyn til å selektere for økt resistens mot avlusningsmidlene. Endelig har det vært en målsetting å undersøke betydningen av sammensetningen av luse-prøver fra et anlegg for variasjonen i grad av resistens mot lusemidler, herunder for eksempel om lus samles fra vanlig fisk eller såkalte svimere eller om det er stor variasjon mellom merder selv om merdene tilsynelatende har lik behandlingshistorikk.

2. Prosjektgjennomføring

Utvalg lokaliteter

Resistenstesting i prosjektet har omfattet molekylær påvisning av egenskaper knyttet til resistens mot azametifos, pyretroider og hydrogenperoksid. Prosjektet var planlagt med 4 arbeidspakker (AP 1-4), hvorav AP1 omfattet utvalg av lokaliteter for videre studie. Et kriterium for valg av lokaliteter var at de ikke skulle ha for høyt innslag av genetisk resistens, for å gi grunnlag for gode statistiske beregninger og kunne evaluere endringer i resistensprofil før og etter behandling. Prøver av lakselus ble derfor tatt ut av personale fra Patogen i forkant av lusebehandlinger på aktuelle lokaliteter og analysert for resistensegenskaper mot gitte behandlingsstoff. Dette som grunnlag for vurdering av om lokaliteten skulle følges videre opp i prosjektet.

Prøvetaking av lus

I AP2 skulle man ifølge prosjektplanen hente ut prøver av lus til resistenstesting fra minimum 2 merder i 6 lokaliteter for hvert behandlingsmiddel. Prøvene skulle tas ut i to omganger, før og etter behandling. I tillegg ble det hentet inn detaljert informasjon om selve behandlingen, herunder hvilke konsentrasjoner som ble brukt, hvor lang eksponeringstid fisken ble behandlet med, temperatur under behandling og fiskestørrelse (Tabell 1). Endelig ble det hentet inn tall fra lusetellinger før og etter behandling.

Tabell 1. Gjennomsnittlige verdier for behandlingsspesifikke data for merder behandlet med azametifos, pyretroider eller hydrogenperoksid.

| Behandlingsmiddel | Tid mellom prøver (dager) | Temperatur | Dose | Enhet | Holdetid (min.) | Fiskestørrelse (kg.) | Antall fisk |
|-------------------|---------------------------|------------|------|-------------------|-----------------|----------------------|-------------|
| Azametifos | 15,8 | 6,7 | 0,28 | ml/m ³ | 60 | 3,9 | 119789 |
| Pyretroider | 12,1 | 7,2 | 0,30 | ml/m ³ | 37 | 4,5 | 140037 |
| Hydrogenperoksid | 5,5* | 6,4 | 2,16 | ppt | 34 | 1,9 | 151395 |

*For en av merdene behandlet med hydrogenperoksid var prøveuttaket av lus først 35 dager etter behandling, og dette inngår ikke i gjennomsnittsberegningen

Analyser av data og formidling

AP 3 omfattet statistisk analyse av dataene som er samlet inn i prosjektet, mens AP 4 omfattet formidling av resultater og sluttrapportering. Denne sluttrapporten for prosjektet oppsummerer prosjektaktivitetene knyttet til disse tre behandlingssmidlene.

Endringer i prosjektplanen

Prosjektet startet opp i november 2014 og var planlagt avsluttet 30.12. 2015. På grunn av vanskeligheter med å finne passende lokaliteter å hente aktuelle prøver fra, så ble prosjektslutt utsatt til 31. desember 2016.

Som et resultat av diskusjoner innad i styringsgruppen for prosjektet, ble prosjektplanene endret til også å undersøke variasjon i resistensegenskapene til lus prøvetatt fra ulike merder og ulike vertsfisk (svimere vs. normal fisk) med en ukes mellomrom og uten noen behandling i mellomtiden.

3. Prøvetaking av lus før og etter behandling for ulike lusemidler

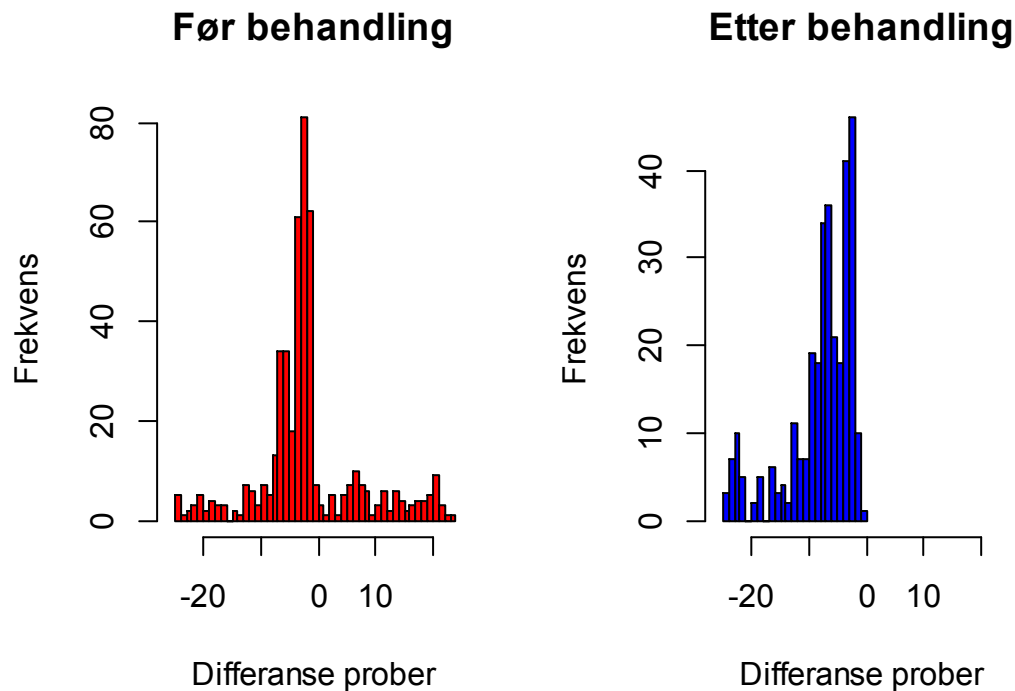
Azametifos

For azametifos har det vært foretatt prøveuttak før og etter behandling fra i alt 4 lokaliteter, hvorav én merd i to av lokalitetene og to merder i to av lokalitetene (Tabell 2).

Tabell 2. Antall lus testet for resistensegenskaper mot azametifos før og etter behandling, fra seks merder i fire lokaliteter.

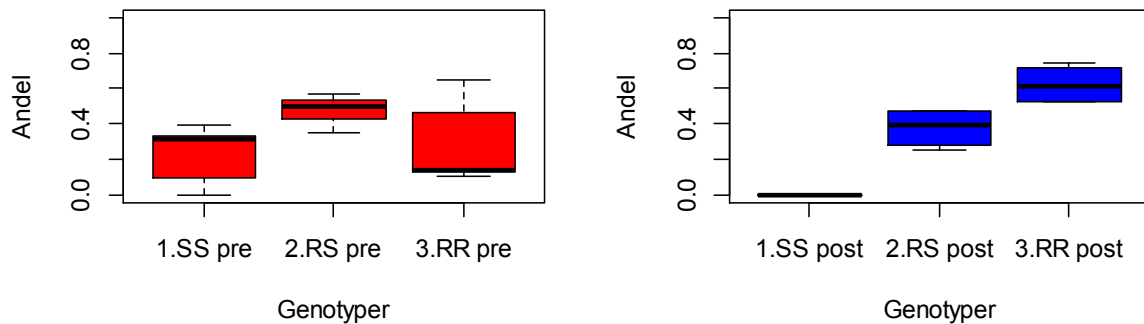
| Lokalitet | Merder | Ant lus før | Ant lus etter |
|-----------|--------|-------------|---------------|
| 1 | 1 | 60 | 60 |
| 2 | 1 | 58 | 60 |
| 3 | 2 | 115 | 81 |
| 4 | 2 | 177 | 139 |

Resistensegenskapene til luseindivid knyttet til azametifos karakteriseres på bakgrunn av forholdet mellom to molekulære prober som påviser varierende aminosyresammensetning i asetylcholin-esterase protein. Figur 1 viser frekvensfordelinger av differansen mellom ct-verdier fra disse probene, der prøvene er tatt henholdsvis før og etter behandling. Frekvensfordelingene viser tydelig at de homozygote mottakelige luseindividene, karakterisert ved positiv differanse, er fraværende etter behandling. Videre er det tydelig at andelen homozygot resistente lus, med de laveste differansene, har økt etter behandling.



Figur 1. Frekvensfordeling av differanser mellom de to ct-verdiene fra probene som benyttes til å karakterisere azametifos-resistens i lakselus. Venstre panel viser fordelingen før behandling og høyre panel etter behandling.

Fra figur 1 er det tydelig at behandlingseffektiviteten må være nært 100% for homozygot mottakelige luseindivid i fullskala merd-behandlinger med azametofos. Figur 2 viser endringene i andeler av de ulike genotypene før og etter behandling i de 6 forsøksmerdene.



Figur 2. Boksplot av andeler av de ulike genotypene knyttet til azametifos resistens før (venstre panel) og etter (høyre panel) behandling (horisontal strek angir median, boksene angir 25 – 75% kvartiler og stolpene dekker maks og min verdier) .

En antagelse om 100% dødelighet av homozygot mottakelige luseindivider under azametifos-behandling, medfører at man kan anslå behandlingsspesifikk dødelighet av heterozygote individer og homozygot resistente individer på bakgrunn av genotypeforekomster før og etter behandling (Tabell 3).

Tabell 3. Antall og andeler av genotyper før og etter azametifos-behandling i de seks forsøksmerkene.

| Merd | SS_før | RS_før | RR_før | SS_etter | RS_etter | RR_etter |
|----------------|--------|--------|--------|----------|----------|----------|
| 1 | 4 | 23 | 33 | 0 | 17 | 43 |
| 2 | 7 | 29 | 22 | 0 | 15 | 44 |
| 3 | 18 | 32 | 6 | 0 | 10 | 16 |
| 4 | 23 | 28 | 8 | 0 | 24 | 27 |
| 5 | 20 | 31 | 8 | 0 | 23 | 35 |
| 6 | 18 | 31 | 8 | 0 | 26 | 29 |
| Andeler | | | | | | |
| 1 | 0,07 | 0,38 | 0,55 | 0,00 | 0,28 | 0,72 |
| 2 | 0,12 | 0,50 | 0,38 | 0,00 | 0,25 | 0,75 |
| 3 | 0,32 | 0,57 | 0,11 | 0,00 | 0,38 | 0,62 |
| 4 | 0,39 | 0,47 | 0,14 | 0,00 | 0,47 | 0,53 |
| 5 | 0,34 | 0,53 | 0,14 | 0,00 | 0,40 | 0,60 |
| 6 | 0,32 | 0,54 | 0,14 | 0,00 | 0,47 | 0,53 |

Ved å teste ulike dødelighetsscenarier for RS og RR på fordelingene av genotyper før behandling, gitt at 100% av SS dør, resulterer dette i potensielle fordelinger etter behandling. Disse potensielle fordelingene kan så sammenlignes med de observerte

fordelingene etter behandling. Så, ved å minimere avvikene mellom de potensielle og observerte fordelingene, ved:

$$\sum(\text{observert} - \text{predikert})^2,$$

kan man beregne mest sannsynlige behandlingseffekter for RS og RR parvis, basert på alle seks fordelinger av genotyper før og etter behandling. Gitt ingen behandlingsspesifikk dødelighet for RR blir den mest sannsynlige dødeligheten for RS ~ 48%. Gitt dødelighet på 10% for RR, tilsvarer dette en dødelighet på 43% av RS. Beregnet behandlingseffekt gitt SS = 100%, RS = 48% og RR = 0% er sammenlignet med behandlingseffekt basert på lusetellinger før og etter behandling i tabell 4.

Tabell 4. Behandlingseffekt basert på endringer i genotyper med dødeligheter for genotyper satt til SS = 100%, RS = 48% og RR = 0% (BehGen), og basert på basert på lusetall (BehLusTall), beregnet etter følgende formel: $(1 - ((\text{snitt mobile} + \text{kjønnsmodne hunner etter}) / (\text{snitt mobile} + \text{kjønnsmodne hunner før})))$.

| Merd | BehGen | BehLusTall |
|------|--------|------------|
| 1 | 0,26 | 0.59 |
| 2 | 0,38 | 0.81 |
| 3 | 0,63 | 0.73 |
| 4 | 0,61 | 0.88 |
| 5 | 0,74 | 0.91 |
| 6 | 0,73 | 0.92 |

Behandlingseffekt beregnet på bakgrunn av endringer i genotyper var konsekvent lavere enn effekt beregnet fra lusetall. Differansen mellom beregningsmetodene reflekterer sannsynligvis uspesifikk dødelighet av lus som følge av håndtering av fisk under behandling. For øvrig var det rimelig overensstemmelse mellom beregningsmetodene, noe som understøtter forutsigbarheten av utfallet av behandling for ulike genotyper lakselus med hensyn til azametifos-resistens.

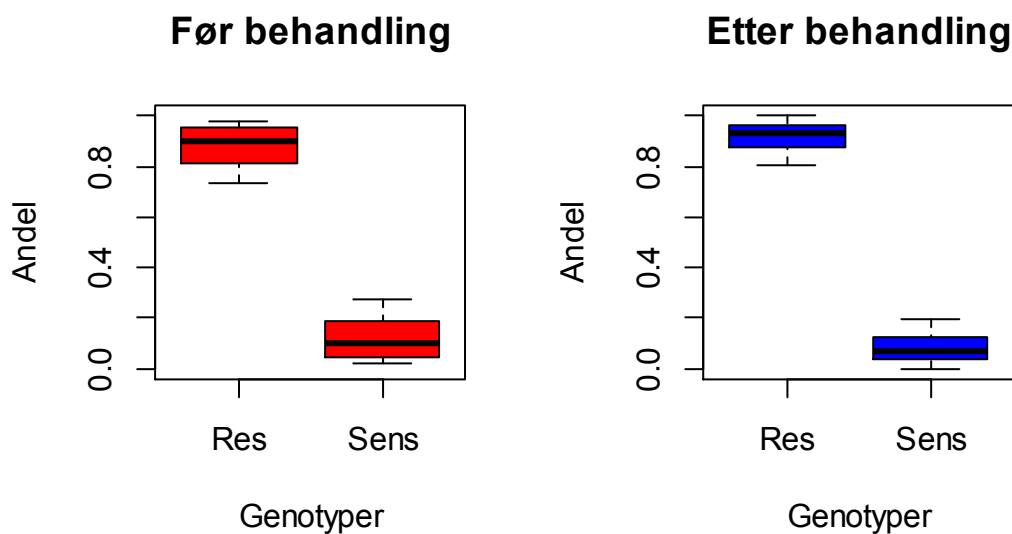
Pyretroider

For pyretroider har det vært foretatt prøveuttak før og etter behandling fra i alt 7 lokaliteter, hvorav kun én merd i to av lokalitetene og to merder i 5 av lokalitetene (Tabell 5).

Tabell 5. Antall lus testet for resistensegenskaper før og etter behandling med pyretroider, fra i alt 12 merder fra syv lokaliteter.

| Lokalitet | Merder | Ant lus før | Ant lus etter |
|-----------|--------|-------------|---------------|
| 1 | 1 | 49 | 54 |
| 2 | 1 | 60 | 15 |
| 3 | 2 | 139 | 44 |
| 4 | 2 | 178 | 121 |
| 5 | 2 | 180 | 54 |
| 6 | 2 | 120 | 57 |
| 7 | 2 | 192 | 42 |

Figur 3 viser endringene i andeler av luseindivid som ble karakterisert som resistente og luseindivid karakterisert som mottakelige mot pyretroider før og etter behandling i de 12 forsøksmerdene.



Figur 4. Boksplo av andeler av luseindivid som ble karakterisert som resistente eller sensitive mot pyretroider før (venstre) og etter (høyre) behandling (se forklaring fig. 2).

Endringene av sammensetning av lus som var resistente versus mottakelige mot pyretroider før og etter behandling var relativt liten, men slik at andelen resistente lus økte etter behandling. De moderate endringene kan skyldes at graden av resistens var høy i alle prøvetatte merder også før behandling. Det viste seg svært vanskelig å finne lokaliteter som var relativt sensitive for pyretroider før behandling.

Tabell 6 angir andelen luseindivid som ble karakterisert som resistente mot pyretroider før og etter behandling, samt behandlingseffekt beregnet fra lusetellinger, for forsøksmerdene hver seg.

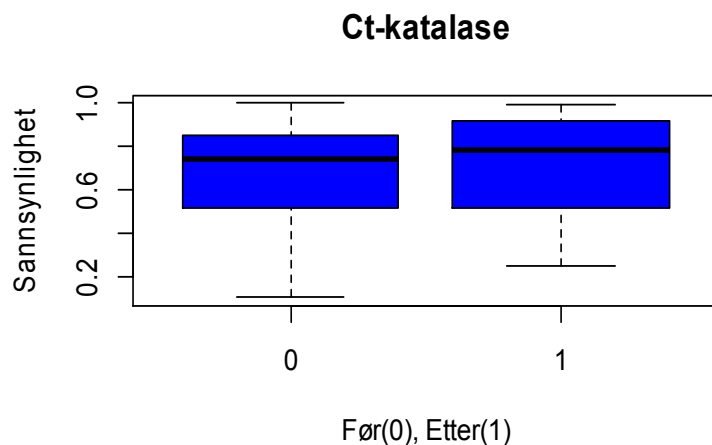
Tabell 6. Andelen resistente luseindivid på lokaliteter og merder (angitt med bokstaver der det er mer enn 1) før og etter behandling. Kolonnen Beh.effekt angir behandlingseffekt beregnet på bakgrunn av lusetall, slik som beskrevet i høyre kolonne i tabell 3.

| LokalitetMerd | R før | R etter | Beh. effekt |
|---------------|-------|---------|-------------|
| 1a | 0,92 | 0,89 | 0,92 |
| 1b | 0,78 | 0,81 | 0,98 |
| 2a | 0,96 | 0,98 | 0,97 |
| 2b | 0,96 | 0,95 | 0,91 |
| 3 | 0,98 | 0,94 | 0,72 |
| 4a | 0,98 | 0,92 | 0,68 |
| 4b | 0,96 | 0,97 | 0,68 |
| 5a | 0,90 | 0,90 | 0,26 |
| 5b | 0,90 | 0,96 | 0,64 |
| 6 | 0,73 | 1,00 | NA |
| 7a | 0,85 | 0,87 | NA |
| 7b | 0,73 | 0,83 | NA |

Som det fremgår av tabell 6 var det svært høye andeler av luseindividene som var resistente både før og etter behandling. Behandlingseffekter beregnet på bakgrunn av lusetellinger var i noen tilfeller relativt høye i forhold til graden av resistens før behandling.

Hydrogenperoksid

For hydrogenperoksid er det testet for uttrykt katalasenivå hos lus før og etter behandling ved tre lokaliteter, hvorav 2 merder i to av lokalitetene (5 forsøksenheter). Figur 5 viser gjennomsnitt av beregnet sannsynlighet for at lus skal dø før og etter behandling, der beregningene er gjort på bakgrunn av katalasenivå.



Figur 5. Beregnete gjennomsnittlige sannsynligheter for lusedødelighet, der beregningene er gjort før (0) og umiddelbart etter (1) faktisk behandling (se forklaring fig 2).

Det var ingen åpenbar forskjell i katalase-uttrykk før og etter behandling på lokalitetene. Etter undring rundt dette resultatet, kom det opp en idé om at dette kunne henge sammen med systematiske forskjeller i katalase-uttrykk for forskjellige stadier av lus og at dette kan være induisert av kroppsstørrelsen til lus. Dataene fra dette prosjektet har dermed vært brukt til å belyse denne idéen.

Tabell 7 viser antall lakselus som er genotypet før og etter behandling med hydrogenperoksid, som omfatter tre lokaliteter og totalt 5 forsøksmerder

Tabell 7. Antall lakselus og andel (%) av ulike kjønn og stadier (A = adult, PA = preadult) som er genotypet for katalase før (pre) og etter (post) hydrogenperoksid-behandling.

| Stadium | Pre beh. | Post beh. | Pre andel | Post andel |
|---------------|----------|-----------|-----------|------------|
| ♀ A | 140 | 80 | 31,2 | 26,8 |
| ♀ Aegg | 67 | 11 | 14,9 | 3,7 |
| ♀ PA1 | 6 | 9 | 1,3 | 3,0 |
| ♀ PA2 | 19 | 34 | 4,2 | 11,4 |
| ♂ A | 203 | 109 | 45,2 | 36,6 |
| ♂ PA1 | 1 | 18 | 0,2 | 6,0 |
| ♂ PA2 | 5 | 18 | 1,1 | 6,0 |
| Ukjent | 8 | 19 | 1,8 | 6,4 |

Tabell 7 viser tydelig at sammensetningen av lus er forskjøvet mot mindre stadier etter behandling. Det ble derfor foretatt en justering av ct-verdiene spesifikt til stadium/kjønn.

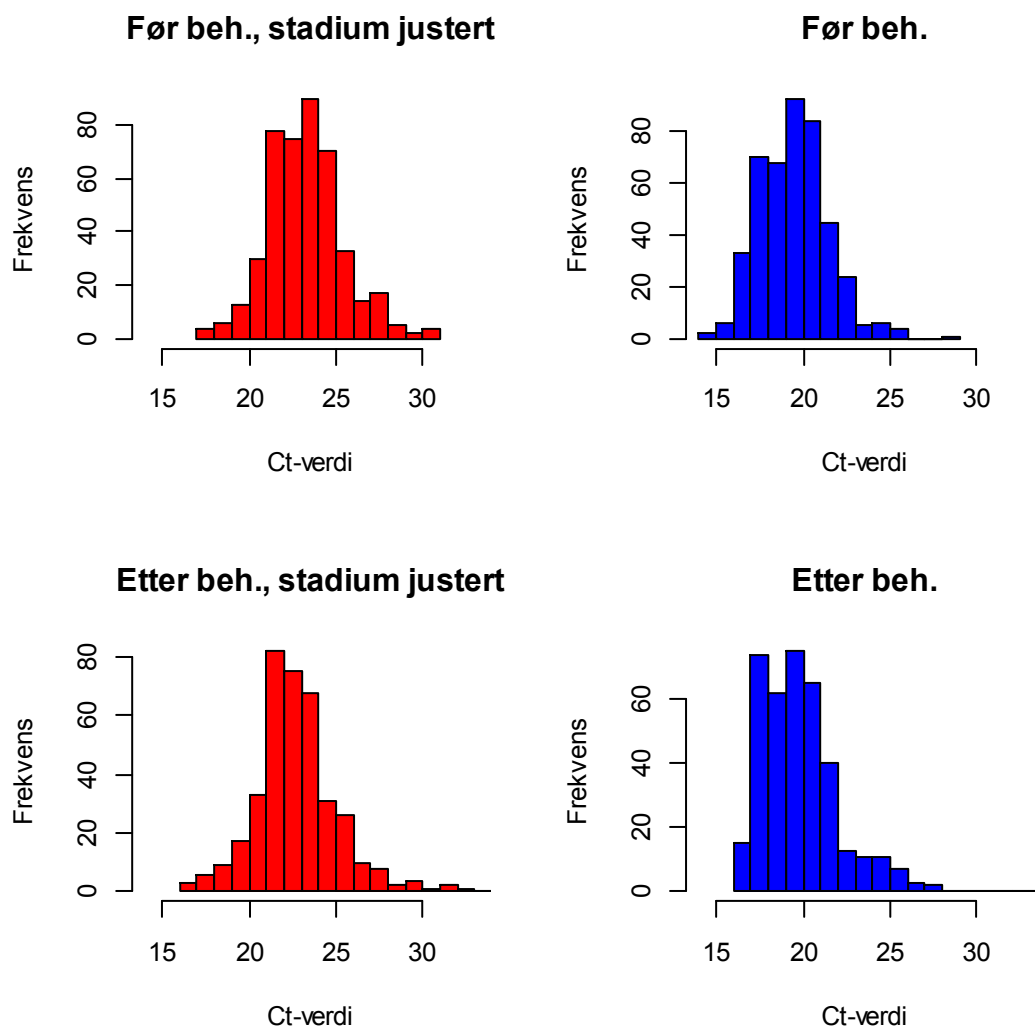
Det ble da først gjort en lineær regresjonsanalyse der Ct-verdier for katalase var avhengig variabel, med stadium og kjønn som faktorielle forklaringsvariable. Datagrunnlaget for analysen var alle luseindivider som er testet for katalase-uttrykk i Patogen sin database. Resultatene fra analysen er gitt i tabell 8.

Tabell 8. Statistikk fra en lineær regresjonsanalyse der Ct-verdier for katalase ble forklart med kjønn og stadium av lakselus. Preadulte 2 (PA2) hunner ble holdt som basis stadium i regresjonsanalysen.

| | Coeff | SEM | t.verdi | Prob |
|-----------------------------|-------|------|---------|------|
| (Intercept) | 25,39 | 0,42 | 60,77 | 0,00 |
| as.factor(Kat) ♀ A | -4,81 | 0,59 | -8,14 | 0,00 |
| as.factor(Kat) ♀ PA1 | -0,36 | 0,61 | -0,59 | 0,56 |
| as.factor(Kat) ♂ A | -3,96 | 0,59 | -6,70 | 0,00 |
| as.factor(Kat) ♂ PA1 | 0,60 | 0,59 | 1,02 | 0,31 |
| as.factor(Kat) ♂ PA2 | -1,42 | 0,58 | -2,46 | 0,02 |

Fra regresjonstabellen er Ct-verdiene justert som følger:

$justertCt = Ct * 25,39 / (25,39 + Coeff_{stadium})$. Ct verdiene standardiseres dermed etter hunnlus av Preadult 2 stadiet, som tilsvarer stadiet benyttet i bioassay-forsøk som ligger til grunn for beregningene av sannsynlighet for dødelighet ved eksponering mot hydrogenperoksid. Resultatene av dette er vist i venstre panel av figur 6, sammenlignet med ikke-justerte verdier i høyre panel.



Figur 6. Frekvensfordeling av ct-verdier for katalase før og etter hydrogenperoksid-behandling fra 5 merder fordelt på 3 lokaliteter som inngår i FHF-merdivariasjon prosjektet. De venstre figurene (rødt) er justert etter kjønn/stadium på lus.

Gjennomsnittlige Ct-verdier før og etter behandling er gitt i tabell 9.

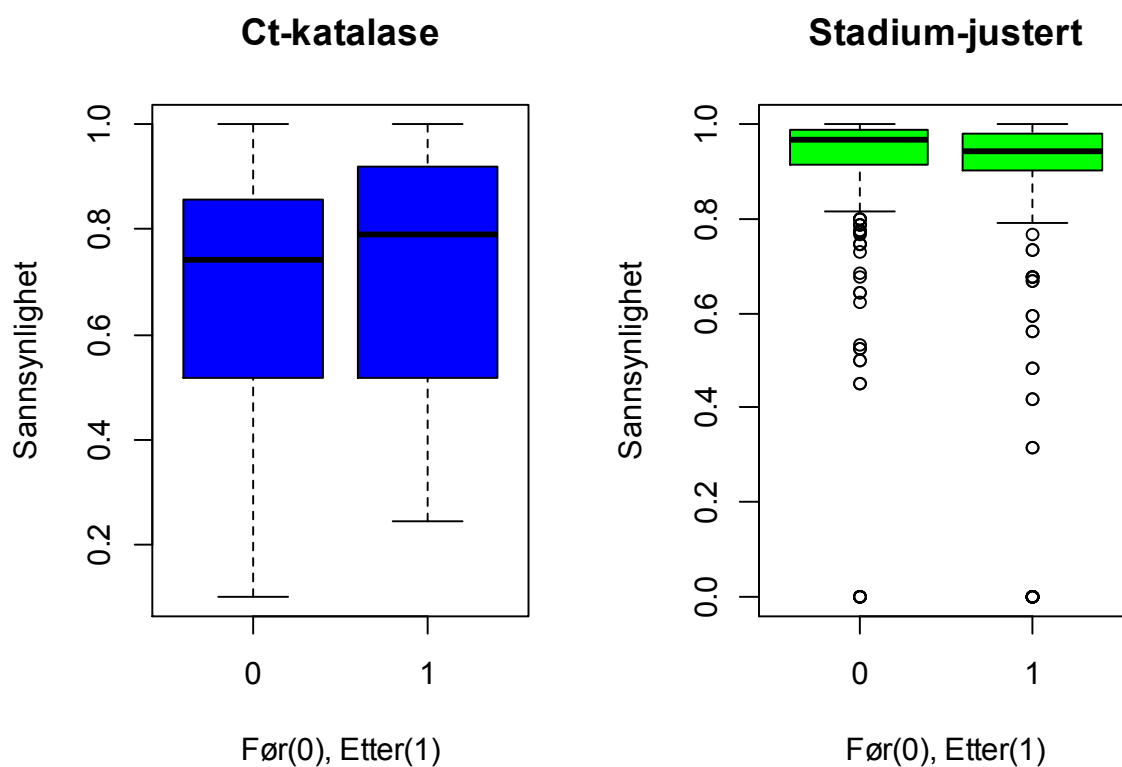
Tabell 9. Gjennomsnittlige Ct-verdier før og etter hydrogenperoksid-behandling, der venstre kolonne er justert etter stadium.

| | Justert | Ikke justert |
|-------------------------|---------|--------------|
| Før behandling | 23.27 | 19.5 |
| Etter behandling | 22.92 | 20.0 |

Effektene av justering er nyttige å vurdere i forhold til beregnede sannsynligheter for at lus skal dø. Gjennomsnittlig beregnet sannsynlighet for at lus skal dø, altså beregnet behandlingseffekt, er gjengitt i tabell 10.

Tabell 10. Gjennomsnittlig beregnet sannsynlighet for dødelighet for ujusterte ct-verdier og stadium-justerte ct-verdier.

| | Katalase | Stadium justert katalase |
|-------------------------|----------|--------------------------|
| Før behandling | 0,66 | 0,91 |
| Etter behandling | 0,72 | 0,85 |



Figur 11. Boksplot som viser beregnede sannsynligheter for at lus skal dø fra katalase ct-verdier som stammer fra FHF merdivariasjon prosjektet. Venstre figur viser beregninger fra ujusterte ct-verdier mens høyre figur viser beregninger fra stadium-justerte ct-verdier.

Selv om forskjellene mellom sannsynlighetsberegningene for lusedødelighet før og etter behandling fremdeles ikke er så store etter justering i henhold til stadium, er retningen i det minste riktig. Disse relativt små endringene, for eksempel sammenlignet med azametifos, kan bety at seleksjonen mot resistens er relativt svak til sammenligning. Det kan imidlertid også reflektere andre forhold som vi ikke har kontroll på, som for eksempel re-smitte av «svimeslåtte» luseindivider etter behandling?

Merd og vertsvariasjon i resistensegenskaper

For å undersøke om resistensegenskapene i en populasjon av lakselus på en lokalitet varierer mellom merder, mellom to tidspunkt for prøvetaking uten behandling i mellomtiden, eller mellom vanlige fisk eller såkalte «svimere», ble det genotypet lus fra 4 merder og ved to anledninger med én ukes mellomrom. Det ble ikke behandlet med noe lusemiddel på denne lokaliteten i forbindelse med denne prøvetakingen.

Azametifos

Tabell 11 gjengir forekomst av ulike genotyper av lus knyttet til azametifos resistens.

Tabell 11. Fordelingen av antall og andeler (%) av lus genotypet til RR, RS eller SS genotype ved to prøvetakingstidspunkt, for svimere versus normal fisk og i 4 ulike merder ved lokaliteten.

| Prøveuttak | Antall | | | Andeler (%) | | |
|-------------|--------|-----|----|-------------|------|------|
| | RR | RS | SS | RR | RS | SS |
| Dato 5/9 | 70 | 119 | 22 | 33,2 | 56,4 | 10,4 |
| Dato 12/9 | 182 | 250 | 48 | 37,9 | 52,1 | 10,0 |
| Normal fisk | 188 | 259 | 57 | 37,3 | 51,4 | 11,3 |
| Svimere | 64 | 110 | 13 | 34,2 | 58,8 | 6,9 |
| Merd 1 | 58 | 98 | 18 | 33,3 | 56,3 | 10,3 |
| Merd 4 | 59 | 89 | 13 | 36,6 | 55,3 | 8,1 |
| Merd 7 | 63 | 96 | 18 | 35,6 | 54,2 | 10,2 |
| Merd 8 | 72 | 86 | 21 | 40,2 | 48,0 | 11,7 |

Det var ingen signifikante forskjeller i fordelingen av genotyper knyttet til azametifos-resistens, hverken for de to prøvetakingsdatoene (chi-kvadrat test; X-squared = 1.44, df = 2, p-value = 0.49), for svimere versus normal fisk (chi-kvadrat test; X-squared = 4,32, df = 2, p-value = 0,11), eller mellom de ulike merdene (chi-kvadrat test; X-squared = 3,70, df = 6, p-value = 0.71).

Pyretroider

Tabell 12 gjengir forekomst av ulike genotyper av lus knyttet til resistens mot pyretroider. Det var ingen signifikante forskjeller i fordelingen av genotyper knyttet til pyretroide-resistens, hverken for de to prøvetakingsdatoene (chi-kvadrat test; X-squared = 0.44, df = 1, p-value = 0.51), for svimere versus normal fisk (chi-kvadrat test; X-squared = 0.06, df = 1, p-

value = 0.81), eller mellom de ulike merdene (chi-kvadrat test X-squared = 4,6, df = 4, p-value = 0.20).

Tabell 12. Fordelingen av antall og andeler (%) av lus genotypet til R eller S genotype ved to prøvetakingstidspunkt, for svimere versus normal fisk og i 4 ulike merder ved lokaliteten.

| Prøveuttak | Antall | | Andeler (%) | |
|-------------|--------|----|-------------|-----|
| | R | S | R | S |
| Dato 5/9 | 202 | 10 | 95,3 | 4,7 |
| Dato 12/9 | 464 | 16 | 96,7 | 3,3 |
| Normal fisk | 485 | 20 | 96,0 | 4,0 |
| Svimere | 181 | 6 | 96,8 | 3,2 |
| Merd 1 | 168 | 7 | 96,0 | 4,0 |
| Merd 4 | 157 | 4 | 97,5 | 2,5 |
| Merd 7 | 173 | 4 | 97,7 | 2,3 |
| Merd 8 | 168 | 11 | 93,8 | 6,1 |

Hydrogenperoksid

Tabell 13 gjengir ct-verdier for uttrykt katalase, som er knyttet til følsomhet mot hydrogenperoksid.

Tabell 13. Antall fisk (N), gjennomsnittlig ct-verdi, og max og min ct-verdi ved to prøvetakingstidspunkt, for svimere versus normal fisk og i 4 ulike merder ved lokaliteten.

| Prøveuttak | N | Ct-verdi(snitt) | max | min |
|-------------|-----|-----------------|------|------|
| Dato 5/9 | 211 | 21,27 | 29,8 | 16,2 |
| Dato 12/9 | 478 | 20,0 | 26,1 | 17,5 |
| Normal fisk | 502 | 20,32 | 29,8 | 16,2 |
| Svimere | 187 | 20,56 | 27,2 | 17,5 |
| Merd 1 | 172 | 21,45 | 29,8 | 18,2 |
| Merd 4 | 161 | 19,95 | 27,2 | 16,2 |
| Merd 7 | 177 | 19,67 | 26,9 | 16,4 |
| Merd 8 | 179 | 20,47 | 25,2 | 16,8 |

Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i ct-verdier mellom normale fisk og svimere (t-test, $t = -1,49$, $p = 0.136$). Det var imidlertid signifikant forskjell i ct-verdier mellom datoer for prøveuttak (t-test, $t = 5.9$, $p < 0.001$), og mellom merder (enveis anova, F-verdi = 27.46, $p < 0.001$).

4. Konklusjoner

Prøvetakingene før og etter behandling med azametifos viser sterk seleksjon mot resistente genotyper. Merdivariasjon vil dermed oppstå ved ulike behandlingshistorikk innen et anlegg. Også for pyretroider var det en seleksjon mot økende resistens ved behandling. Forskjellene var imidlertid mindre tydelige enn for azametifos, men dette skyldes at det var utbredt resistens i alle prøvetatte merder før behandling. For hydrogenperoksid var det ikke tydelige systematiske forskjeller i grad av katalaseuttrykk før og etter behandling.

Prosjektet nådde ikke fullt ut målsetningen med å opparbeide prøver fra så mange merder som var i planen. Delvis skyldes dette at arbeidsmengden knyttet til å ta det nødvendige antallet lus, særlig etter behandling, viste seg å være en for stor arbeidsbelastning. I tillegg er det særskilte grunner knyttet til hvert behandlings-stoff. For azametifos er det for få anlegg som benytter dette middelet for seg selv til behandling. For pyretroider har det vært vanskelig å finne anlegg med lus som har moderat eller mindre forekomst av resistente lus. For hydrogenperoksid har det vært nødvendig å sortere ut grunner til at uttrykk av katalase ikke har sett ut til å endre seg på en forutsigbar måte i lus som er prøvetatt før og etter behandling.

Fra forsøkene som fokuserte på merd- og vertsvariasjon i resistensegenskaper uten direkte tilknytning til noen behandlingsepisode, var det for azametifos og pyretroider av underordnet betydning om lus stammet fra normale fisk eller såkalte svimere. Videre var det ikke av betydning hvilken merd lus ble samlet fra eller om de var samlet inn første eller andre uke. Dette tyder på at store nok utvalg av lus vil være representative for hele anlegget, uavhengig av hvilke merder eller vertsfisk lus er samlet fra, gitt at merdene har lignende behandlings-historikk hva angår midlene azametifos og pyretroider.

For hydrogenperoksid var det signifikante forskjeller både mellom tidsperioder og mellom merder, uten at vi vet hva disse forskjellene skyldes.

Nye kunnskapsbidrag fra prosjektet har vært utvikling av metode for å beregne genotype-spesifikk dødelighet ved behandling knyttet til azametifos-resistens. Prosjektet har også bidratt til større innsikt i stadium- og størrelses-spesifikt uttrykk av katalase i lus.

Nytteverdien av prosjektet for oppdrettsnæringen kan oppsummeres med:

- Resultatene underbygger generelt en restriktiv strategi hva angår bruk av kjemiske midler i bekjempelsen av lakselus, både ved at behandlingene viste sterk selektiv kraft for resistensutvikling og ved at resistens mot organofosfater og pyretroider var utbredt.
- For organofosfater spesielt, viser resultatene at genetisk testing for resistensegenskaper i forkant av en eventuell behandling vil gi en god indikasjon på potensiell behandlingseffekt og en forutsigbar endring i genotype-sammensetning etter en behandling.

- Endelig sannsynliggjorde resultatene fra prosjektet at genetisk testing av et utvalg lus på en lokalitet vil være representativt for lusepopulasjonen på lokaliteten, uavhengig av hvilken merd eller vertsfisk utvalget innsamles fra.

5. Leveranser

Poster

Jansen, P.A., Røyset, K.A. & Aspehaug, V. 2016. Selective changes in pre- and post-treatment proportions of salmon lice alleles related to organophosphate resistance. Poster, The 11th International Sea Lice Conference. Westport, Ireland. 26-28 September 2016.

Foredrag:

Jansen, P.A. 2016. Overgang fra bioassay til molekylære verktøy for overvåking av luseresistens. Patos Forum, Ålesund 27-28 april 2016.

Vitenskapelig artikkel under utarbeidelse:

Helgesen, K.O., Jansen, P.A., Røyset, K.A. & Aspehaug, V. 2016. Selective changes in pre- and post-treatment proportions of salmon lice alleles related to organophosphate resistance.