

**Bendelorm (*Eubothrium* sp.) hos laks (*Salmo salar*): Utprøving av nye
behandlingsmidler og utvikling av et *in vitro* bioassay for måling av
resistens overfor praziquantel.**

Rapport fra et pilotprosjekt

Sponsorer: Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF)
Postboks 429, Sentrum, 0103 Oslo

Skretting AS
Sjøhagen 15, 4016 Stavanger
Produktsjef Cand. scient. Elisabeth Aasum

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

Studien er gjennomført av:

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

Veterinærinstituttet Bergen
Pb 1263 Sentrum
5811 Bergen
Dr. Hege Hellberg

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	2
1. Sammendrag	3
2. Bakgrunn	4
3. Innledning.....	4
4. Hovedmål	5
5. Gjennomføring	6
5.1. Forsøk 1, tillaging av pasta	6
5.2. Intubering	6
5.3. Forsøk 2, tillaging av pellet med behandlingsmidler	7
5.4. Intubasjon	7
5.5. Forsøk 3, tillaging av pellet med behandlingsmidler	8
5.6. Intubasjon	8
5.7. Bieffekt.....	8
5.8. Bestemming av antallet bendelorm	8
5.9. Statistikk.....	9
6. Resultater.....	9
6.1. Fordeling	9
6.2. Antall bendelorm i fisken etter behandling i forsøk 1.....	9
6.3. Antall bendelorm ved avslutning i forsøk 2	10
6.4. Synlige bivirkninger	10
6.5. Vekt	11
6.6. Antall bendelorm i forhold til vekt.....	11
6.7. Antall bendelorm ved avslutning i forsøk 3	11
6.8. Bieffekter.....	12
7. Diskusjon.....	12
7.1. Forsøk 1	12
7.2. Forsøk 2.....	13
7.3. Forsøk 3.....	14
7.4. Generelt	14
8. Utvikling av bioassay	15
8.1. Innsamling av bendelorm	15
8.2. Overlevelse i medium.....	15
8.3. Gjennomføring av bioassay	15
8.4. Resultater.....	16
9. Konklusjoner	16
10. Videre arbeid	17
11. Referanser.....	18
Appendix 1	19
Resultater fra forsøk 1	19
Appendix 2	20
Resultater fra forsøk 2, antall bendelorm etter behandling	20
Resultat fra forsøk 2, sammenheng mellom vekt og antall bendelorm	21
Appendix 3	22
Resultater fra delstudie 3	22
Appendix 4	23
Appetitt etter behandling med fenbendazol	23
Appendix 5	24
Resultater fra histologi (forsøk 3)	24

1. Sammendrag

I flere oppdrettsdistrikter er det problemer med behandling av bendelormen *Eubothrium* sp., på grunn av manglende effekt av det antiparasittære midlet 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 kaskadeprinsippet (direktiv 2001/ 82/ EF, artikkel 10). Behandlet fisk vil få en tilbakeholdelsestid på 500 døgngrader. I dette prosjektet ble effekten av de alternative behandlingsmidlene albendazol (Valbazen, Pfizer), fenbendazol (Panacur, Intervet), morantel (Exhelm, Pfizer) og oxfendazol (Systemex, Schering Plough), sammenlignet med effekten av praziquantel. Dette ble gjort med forsøk der tentative doser av midlene ble gitt til forsøksfisken ved intubasjon, og i et tilfelle utføring av fenbendazol. Det ble utført 3 forsøk: Forsøk 1 ble utført på et anlegg med antatt resistent bendelorm. Fisken ble intubert pasta (1 % av kroppsvekt) med legemidler. Resultatet ble evaluert etter 14 dager. Forsøk 2 ble utført i samme anlegg, samtidig som det ble utført en feltbehandling med fenbendazol. Det ble intubert pellet (0.5 %) med legemidler. Resultatet ble evaluert etter 14 dager. Forsøk 3 ble utført i et anlegg med sensitiv bendelorm, og fisken ble intubert pellet (0.5 %) med tentativ, og halv dose av praziquantel og fenbendazol. Resultatet ble evaluert etter 5 dager, samtidig ble det tatt ut histologiske prøver av magesekk og tarm for undersøkelse av bivirkninger. Resultatene viste: a) Bendelormen, i anlegget der studie 1 og 2 ble gjennomført, er resistent overfor praziquantel, b) fenbendazol er det alternative behandlingsmiddelet med best effekt av de undersøkte alternative midlene, c) feltbehandling med fenbendazol ga bedre effekt enn intubasjon, d) appetitten ble redusert ved feltbehandling med fenbendazol. Histologiske prøver påviste ikke bivirkninger i form av skader på tarm eller magesekk etter behandling med fenbendazol eller praziquantel. Det ble også startet forsøk for å utvikle et *in vitro* bioassay med bendelorm. Resultatene viste at: e) Eneste metode å få hele bendelorm på er å la oppklippede mage/tarmpakker ligge i fysiologisk saltvann 1 – 3 timer, for deretter samle opp individer som løsner, f) bioassay kan gjennomføres i fysiologisk saltvann og avleses etter 12 timer, g) et *in vitro* bioassay må standardiseres ytterligere, dvs undersøke følsomhet i forhold til størrelse, og justere konsentrasjoner. Det er nødvendig å fortsette arbeidet med å finne et alternativ til praziquantel som gir god effekt og lite bieffekt, og som kan benyttes ved temperaturer under 10 °C.

2. Bakgrunn

I enkelte kystdistrikter er det store problemer med manglende effekt av det antiparasittære midlet praziquantel ved behandling av laks infisert med bendelormen *Eubothrium* sp. Det viktigste målet har derfor vært å starte et arbeide som kan resultere i et godt behandlingsalternativ til dette behandlingsmiddelet. Dette pilotprosjektet ble initiert av oppdrettsnæringen, og finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF), Skretting AS og Marine Harvest.

Det ble i juni 2005 søkt Norges Forskningsråd (NFR), under programmet: "Havbruk", om finansiering til en grundigere oppfølging av dette pilotprosjektet. Dessverre ble det negativ respons på denne søknaden.

3. Innledning

Bendelormen *Eubothrium* sp. hos laks tilhører phylum; Platyhelminthes (flatmarker), subklasse Eucestoda og overfamilie Pseudophyllidea. Arten 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 procercoïd. Fisk i sjøvann får i seg parasitten enten ved å spise mellomverten, eller mellomverten følger med sjøvannet når fisken drikker.

Bendelorm (*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), og det er klart at bendelorminfeksjoner står for et betydelig økonomisk tap. Det er også mulig at immunforsvaret blir påvirket negativt ved infeksjon av bendelorm (Are Nylund, UiB pers. med.). Et annet viktig element er at for laks eller ørret som blir solgt usløyd, vil funn av bendelorm ha negative markedsmessige konsekvenser. Det er også etisk uforsvarlig å la fisk gå igjennom produksjonssyklusen med en vedvarende infeksjon med bendelorm.

Bendelorm 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. Tall for gjennomførte behandlinger i 2005 og tilbakemeldinger fra felt viser at problemet nå er større enn noen gang; Hardanger (Olav Breck, Marine Harvest, pers. med. Hardanger Fiskehelsenettverk v/ Randi Haldorsen pers. med.), Hordaland (Are Nylund UiB, pers.med.) Sogn og Fjordane (Aud Aasheim, pers.med.), Møre (Brit Tørud pers. med.) og Hitra / Frøya (Asgeir Østvik, pers.med.). Marine Harvest Norge (Olav Breck, Randi Haldorsen og Henrik Offerdal) gjennomførte i samarbeid med Skretting AS (Elisabeth Aasum og Øyvind Korsøen), en undersøkelse av effekt av praziquantel på antatt resistent *Eubothrium* sp. Bendelorminfisert laks fra et oppdrettsanlegg med behandlingssvikt ble tvangsføret med enkel og dobbel dose

praziquantel. Det viste seg at ingen av dosene hadde signifikant virkning på antall bendelorm i tarmen. En gruppe fisk ble tvangsfôret med fenbendazol, og dette behandlingsmiddelet hadde god effekt. Denne studien ga en klar indikasjon på at *Eubothrium* sp. har utviklet resistens mot praziquantel.

Oppdrettsnæringen har pr. i dag ingen gode alternative midler og har derfor et 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 kaskadeprinsippet (direktiv 2001/ 82/ EF, artikkel 10). Behandlet fisk vil få en tilbakeholdelsestid på minimum 500 døgngrader. Fenbendazol (Panacur, Intervet) er brukt i begrenset grad, men dette legemiddelet kan ha negative bivirkninger i form av økt dødelighet, nedsatt appetitt etter behandling og mulig nedsatt immunforsvar (- økt mottakelighet for andre sykdommer). Det er ikke anbefalt å behandle med fenbendazol når sjøtemperaturen er under 10 °C.

I denne studien ble det besluttet å undersøke effekt av 4 behandlingsmidler som muligens kan representere et alternativ til praziquantel, tabell 1.

Tabell 1. Mulige alternativer til praziquantel for behandling av *Eubothrium* sp. i laks

Legemiddel	Navn	Produsent	Tentativ.dose	Type
Fenbendazol	Panacur	Intervet	10mg/kg	Benzimidazol
Albendazol	Valbazen	Pfizer	10mg/kg	Benzimidazol
Oxfendazol	Systamex	Schering Plough	5mg/kg	Benzimidazol
Morantel	Exhelm	Pfizer	10mg/kg	Tetrahydropyrimidin

Praziquantel fører til en Ca^{2+} innflux i cestoder, og dette er trolig viktig for at middelet virker. Hva dette medfører, og hvorfor parasitten dør er imidlertid ukjent, men det er funnet ut at praziquantel medfører en irreversibel focal vakuolarisering i cestodens integument. Benzimidazol virker ved å hemme polymerisering av beta-tubulin i parasittens celler. Dette gjør at det interne skjelettet i cellene ødelegges, og cellen kan ikke gjennomføre næringsopptak, ekskresjon eller celledeling. Morantel er en nikotinreseptor-agonist, dvs den fører til konstant stimulering av parasittens muskelceller, med muskelspasmer og senere lammelser som resultat.

Et *in vitro* bioassay er tidligere utviklet for lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) (Sevatdal & Horsberg, 2003). Dette er en testmetode som kan standardiseres slik at resultater fra tilsvarende tester utført tidligere kan sammenlignes. Med et slikt bioassay kan sensitiviteten til en organisme overfor et behandlingsmiddel bestemmes. Det er derfor også mulig å kartlegge mulig resistens utvikling 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

Viktige hovedmål har vært:

1. Starte uttesting av fire alternative behandlingsmidler i forsøk med tvangsfôring av laks infisert med *Eubothrium* sp. – registrere effekt og bieffekter.
2. Starte utviklingen av et *in vitro* bioassay for måling av *Eubothrium* sp. sensitivitet overfor aktuelle behandlingsmidler.

5. Gjennomføring

Det ble utført i alt 3 forsøk med intubering av laks. Disse vil bli referert til i denne rapporten som forsøk 1, 2 og 3. Forsøk 1 ble utført på et Marine Harvest (MH) anlegg på Varaldsøy i Hardangerfjorden. Dette anlegget ble valgt pga høy prevalens av antatt praziquantel resistent bendelorm. Forsøk 2 ble utført på samme anlegg, men samtidig som det ble utført en behandling med fenbendazol i hele anlegget. Dette gjorde det mulig å sammenligne effekt i en forsøksstudie; intubasjon, med effekt av en reell behandling i felt der fisken spiser føret. Forsøk 3 ble utført på et MH anlegg på Syltøy ved Sotra. Dette anlegget skulle behandle fisken mot bendelorm og var interessert i å finne ut om bendelormen i anlegget var sensitiv overfor praziquantel. Et litt annet forsøksoppsett ble derfor valgt for dette anlegget for å finne en metode for bestemmning av følsomhet ved å intubere hel- og halv dose på grupper av fisk. I alle forsøkene fikk fisken en enkeltdose behandlingsmiddel (10mg/ kg) som tilsvarte anbefalt behandlingsregime og dose (5 mg/kg i 2 dager).

Tabell 2. Utførte forsøk, tid og sted

Studie	Oppdrettsanlegg	Start	Slutt	Type studie
1	MH, Varaldsøy	7/9	21/9	Intubasjon av pasta m/ behandlingsmiddel
2	MH, Varaldsøy	17/10	31/10	Intubasjon av pellet m/behandlingsmiddel Felt behandling med fenbendazol
3	MH, Syltøy, Sotra	21/10	26/10	Intubasjon av pellet m/ behandlingsmiddel

Tabell 3. Vannkvalitet, 3 m dyp

Studie	Salinitet-start (‰)	Salinitet-slutt (‰)	Gj.snitt (‰)	Temp.-start (°C)	Temp.-slutt (°C)	Gj.snitt (°C)
1	22	18	22	14.2	12.1	13.7
2	20	28	23.4	11.0	12.2	10.9
3*	-	-	-	-	-	12.0

* Salinitet ble ikke målt på Syltøy i perioden

5.1. Forsøk 1, tillaging av pasta

I forsøk 1 ble det benyttet pasta med 1 gram behandlingsmiddel pr kg ferdig pasta, unntatt for oxfendazol der dosen var 0.5 g/kg. Pastaen ble laget av 4 deler knust tørrfôr (standard 3mm medisinerbærere, Skretting) + 6 deler fysiologisk saltvann, dvs til et kg pasta ble det benyttet 400g pellet + 600 gram fysiologisk saltvann. Pastaen ble laget ved først å knuse/ male pelleten i en kjøkkenmaskin (Braun Multipractic 4259) til det var finmalt. Deretter ble det tilsatt fysiologisk saltvann, og tilslutt behandlingsmiddel. Pastaen ble blandet i 5 minutter for å sikre god fordeling av behandlingsmiddel. Det ble laget 400 g pasta med hvert behandlingsmiddel. Praziquantel, fenbendazol og oxfendazol ble tilsatt som rensesubstanser, dvs 400g ble tilsatt 400 mg (oxfendazol: 200 mg) behandlingsmiddel. Albendazol og morantel ble anskaffet som veterinærmedisinske preparater, henholdsvis; Valbazen (Pfizer, 19 mg/ml) og Exhelm (Pfizer, 58 mg/ml). Ved tillaging av disse preparatene ble volumet legemiddelet trukket fra antall ml fysiologisk saltvann som ble tilsatt (albendazol: 21.05 ml inneholder 400 mg, morantel: 6.9 ml inneholder 400 mg). Før intubasjon ble pasta sugd opp i en 30 ml sprøyte, deretter ble 1 ml veid 20 ganger ved å presse ut 1 ml etter graderingen på sprøyten. En ml pasta veide 1.03g, dvs 1 ml pasta = 1g pasta.

5.2. Intubering

Fisken som skulle benyttes ble håvet opp fra en merd i anlegget (merd 10), plassert i en egen minimerd, og sultet i 2 dager. Ved intubasjonen ble denne minimerden delt slik at en del var

tom, mens den andre delen inneholdt forsøksfiskene. Pastaen sugd opp i 30 ml sprøyter påmontert en sonde; 20 cm akvarieslange (diameter 6mm). Akvarieslangen/ sonden var avrundet i enden. Ved intubasjon ble fisken moderat bedøvet med 50 mg/l metakain (MS 222) i ca. 3 minutter, deretter veid (Mettler 1D5 Multirange). Vekten ble notert på et eget skjema. Fisken ble så intubert ved at en person holdt fisken mens en annen person stakk sonden ned gjennom fiskens spiserør og ned i magesekken. Deretter ble riktig volum pasta i henhold til fiskens vekt applisert i fiskens magesekk. Volumet ble bestemt slik at dosen var 1 ml pr 100 gram (1 %), og slik at fisk på 800 – 899 gram fikk 9 ml, fisk på 900 – 999 gram fikk 10 ml, osv. Etter intubasjon ble fisken blekkmerket (Panjet) ventralt i henhold til tabell 4, og overført til et oppvåkningskar der eventuell oppguling kunne registreres. Fisk som gulpet opp før ble tatt opp og avlivet. Det ble intubert 30 fisk i hver gruppe. Etter oppvåkning ble fisken overført til den tomme delen av minimerden. Antall bendelorm ble registrert etter 2 uker.

5.3. Forsøk 2, tillaging av pellet med behandlingsmidler

I forsøk 2 ble det benyttet pellet med 2 gram behandlingsmiddel pr kg ferdig medisinerert pellet. For å gi fisken en enkeltdose på 10mg/ kg, ble det intubert 0.5 % pellet med behandlingsmiddel. Standard pellet ble medisinerert ved å benytte en blander som roterte pellet sammen med behandlingsmiddel i en 5 liter plasbøtte. Det ble laget 500g medisinerert pellet med hver medisinertype. Praziquantel og oxfendazol ble ikke tatt med i dette forsøket. Fenbendazol (1g) ble løst i 10 ml etanol og 20 ml vann. Albendazol (Valbazen, 19 mg/ml): 500g pellet ble tilsatt 52,7 ml (52.7 ml inneholder totalt 1g). Morantel (Exhelm, 58 mg/ml): 500g pellet ble tilsatt 17.3 ml (17.3 ml inneholder 1g). Etter tilsetning av legemiddel ble det blandet/ tromlet i 10 minutter for å sikre god fordeling av behandlingsmiddelet. Etter blanding ble pelleten tørket i inkubatorskap (Termax, type B 8142) ved 37 °C i 4 timer. Etter tørking var pelleten ikke lenger fuktig på overflaten. Dosene ble beregnet ved å benytte ubehandlet pellet. Vekten på 1 pellet ble beregnet til å være 36.6mg (n=20). Gjennomsnittsvekt på fisken ble oppgitt til å være 1300g, dvs en dose inneholdt 6.5g pellet (antall pellet: 176). Alle doser ble laget ferdige på forhånd i graderte 15 ml polystyrenrør. 6.5g pellet utgjorde et volum på 11 ml i rørene. Enkeltdosene ble derfor ikke veid, men beregnet etter volum. Variasjon i vekt på dosene ble kontrollert i ettertid (n=20, snittvekt=6.46, sd=0.13).

5.4. Intubasjon

Fisken ble sultet i to dager før behandling. Ved gjennomføring av intubasjon viste det seg at det ble nødvendig med ytterligere gradering av doser pga variasjon i fiskens vekt. Fisk som var over 1000 gram fikk hel dose (11 ml pellet). Fisk som var 700 – 999 gram fikk $\frac{3}{4}$ dose pellet (8 ml), fisk som var under 700 g fikk $\frac{1}{2}$ dose pellet (5.5 ml). Ved intubasjon ble fisken håvet opp, veid, intubert og merket i henhold til tabell 4. Det ble intubert 30 fisk i hver gruppe. Fisken ble ikke bedøvet i dette forsøket. Intubasjonen ble gjennomført med sonde laget av 10 ml engangspipetter (Bibby) som var kuttet og avrundet i enden, og 1 ml engangspipetter (Bibby) med 1cm akvarieslange i enden som stempel. Ved intubasjon ble sonden som var fylt med pellet stukket ned i fiskens magesekk, og foret presset inn i magesekken ved hjelp av stempelet. Deretter ble fisken plassert i et eget kar for å registrere eventuell oppguling av før. Antall bendelorm ble registrert etter 2 uker.

5.5. Forsøk 3, tillaging av pellet med behandlingsmidler

I forsøk 3 ble det benyttet pellet som ble tilført behandlingsmiddel etter nøyaktig samme metode som i forsøk 2. Det ble oppgitt en snittvekt på fisken på 800 gram. Det ble laget medisineret pellet med en konsentrasjon på 2g/ kg fôr. Fisken ble intubert 0.5 % av kroppsvekt. Alle dosene ble laget ferdig på forhånd slik at hel dose var på 4g (6.5ml) og halv dose; 2g (3.2ml).

5.6. Intubasjon

Fisken ble sultet i 2 dager før behandling. Ved intubasjon ble fisken håvet opp, bedøvet (MS 222), veid (Vega, S-125-3), intubert ferdige doser uavhengig av variasjon i vekt og merket i henhold til tabell 4. Det ble benyttet samme type sonde som i forsøk 2. Etter intubasjon ble fisken plassert i et eget oppvåkingskar der eventuell oppgulpning av pellet kunne registreres. Etter oppvåkning ble fisken plassert i en egen utspent not som fungerte som en minimerd. I dette forsøket ble ikke kontrollfisken intubert, og heller ikke merket. Det ble benyttet 20 fisk i hver gruppe. Antall bendelorm ble registrert etter 5 dager.

Tabell 4. Behandlingsmidler og merking av fisk i de tre forsøkene

Forsøk	Behandlingsmiddel	Merket	Posisjon
1	Praziquantel	1	Ved brystfinner
	Fenbendazol	2	Mellom bryst og bukfinner
	Albendazol	3	Ved bukfinner
	Oxfendazol	1-2	
	Morantel	1-3	
	Kontroll	2-3	
2	Fenbendazol	1	
	Albendazol	2	
	Morantel	3	
	Kontroll	1-2	
3	Praziquantel, hel dose	1	
	Praziquantel, halv dose	2	
	Fenbendazol, hel dose	3	
	Fenbendazol, halv dose	4	Mellom buk- og gattfinne
	Kontroll	Umerket	

5.7. Bieffekt

Laksen ble avlivet med slag i hodet, gruppetilhørighet bestemt og deretter veid (Mettler 1D5 Multirange). Vekten ble notert på et eget skjema. I forsøk 3 ble fisken ikke veid ved avslutning. Det ble også sett etter eventuelle utvendige skader på fisken. Det ble ikke registrert. I henhold til røkterne på anleggene hadde appetitten generelt vært god i samtlige forsøk. I forsøk 3 ble det tatt ut prøver fra magesekk og overgang mellom pylorus - tynntarm for å vurdere bieffekter. Prøvene ble fiksert med 4 % formalin, og sendt til Veterinærinstituttet, Bergen der de ble undersøkt histopatologisk.

5.8. Bestemming av antallet bendelorm

Mage-pylorus-tarm 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. I forsøk 1 ble også 10 mager fra hver gruppe plassert mellom to glassplater og presses sammen. Ved gjennomlysning ble eventuelle bendelorm som satt igjen i blindsekker registrert. Denne siste fremgangsmåten var svært tidkrevende, men viste at det var viktig å presse ut innholdet i alle blindsekker.

5.9. Statistikk

Forskjeller i antall bendelorm pr fisk er analysert med kontingensanalyse. Sammenheng mellom antall bendelorm og vekt er utført med korrelasjonsanalyse. Alle statistiske analyser er utført med JMP5.0.1(SAS Institute). Resultat av histopatologi er ikke behandlet statistisk fordi det ble ikke funnet skader på tarm eller magesekk som kunne relateres til behandlingen.

6. Resultater

Ved avslutning av forsøk 1 og 2 var det ikke 30 fisk i hver gruppe. I første forsøk døde 1 fisk intubert med fenbendazol 2 dager etter intubasjon. Det var også noen få fisk som ikke kunne identifiseres pga utydelig merke. Antall fisk ved avslutning er vist i tabell 5 og 7. Prevalens for bendelorm i kontrollgruppen var 96.7% (29/30) i forsøk 1, og 100% i forsøk 2.

Tabell 5. Effekt av behandlingsmidler på antall bendelorm, 2 uker etter behandling i forsøk 1 og 2, (n = antall fisk ved avslutning).

Behandlings- middel	Forsøk 1			Forsøk 2		
	Gj.snitt	Std	n	Gj.snitt	Std	n
Albendazol	2.53	2.71	30	4.31	2.76	29
Fenbendazol	1,62	1.24	29	1.18	1.09	28
Fenbendazol, utføret	-			0.17	0.46	30
Morantel	3.07	2.16	30	4.9	4.23	30
Oxfendazol	5.22	5.02	27	-		
Praziquantel	4.17	3.41	30	-		
Kontroll	6.53	3.45	30	6.0	2.26	30

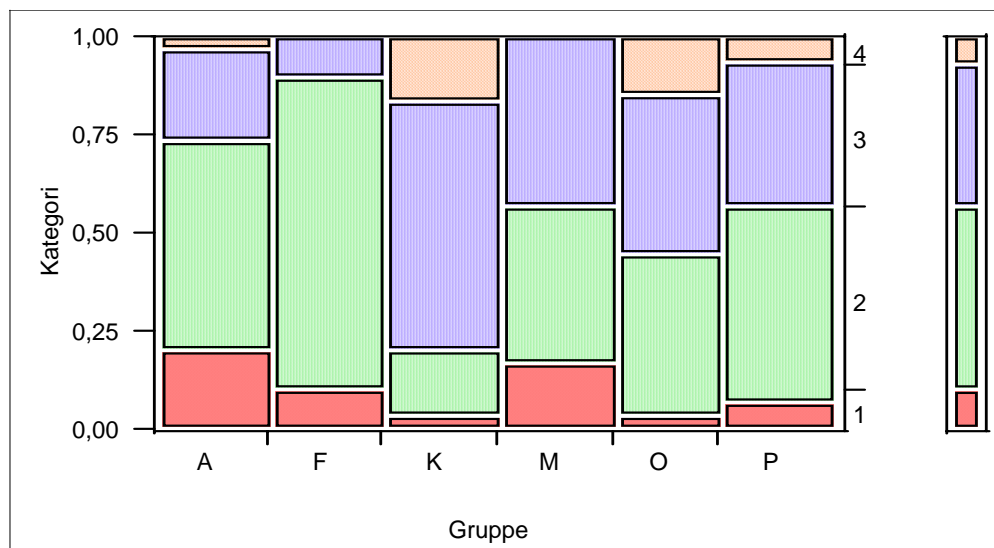
6.1. Fordeling

Antallet bendelorm i fisken var ikke normalfordelt i noen av forsøkene. Derfor ble en ikke-parametrisk test, kontingensanalyse benyttet til å analysere resultatet statistisk.

6.2. Antall bendelorm i fisken etter behandling i forsøk 1

Med den doseringen som ble benyttet i forsøk 1 og 2 viste det seg at fenbendazol var det behandlingsmiddelet som hadde best effekt. Andelen fisk med 1 – 3 bendelorm (kategori 2) er høyest i denne gruppen (figur 2 og appendix 1). Det ble også registrert en tydelig effekt av albendazol og morantel. Andelen fisk uten bendelorm er høyest i disse gruppene, henholdsvis 20% (6/30) og 17% (5/30) (figur 2 og appendix 1). Praziquantel og oxfendazol er de to behandlingsmidlene med minst effekt. Kontingensanalysen viste at det er en signifikant forskjell mellom gruppene ($P < 0.0001$, appendix 1)

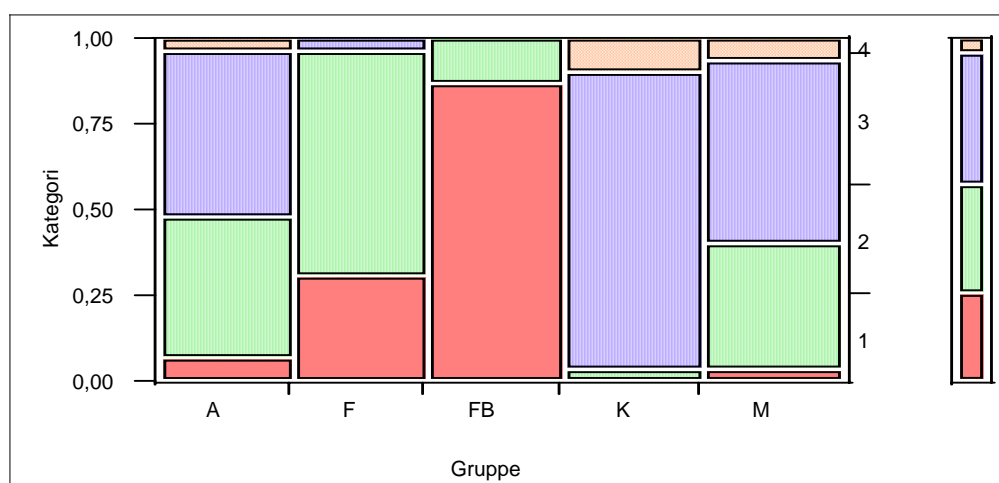
Figur 2. Resultater fra forsøk 1 vist som kontingensanalyse. Følgende kategorier: 1 = 0 bendelorm, 2 = 1 – 3 bendelorm, 3 = 3 – 9 bendelorm og 4 = 10 eller flere. K = Kontroll, A = Albendazol, F = Fenbendazol, P = Praziquantel, O = Oxfendazol og M = Morantel.



6.3. Antall bendelorm ved avslutning i forsøk 2

Behandling med fenbendazol av anlegget ga god effekt. Det ble ikke funnet bendelorm i 87% (26/30) av den undersøkte fisken. Fenbendazol var også det behandlingsmiddelet med best effekt ved intubasjon. Det ble ikke funnet bendelorm i 31% (9/29) i denne gruppen. Antall fisk i kategori 2 (1-3 bendelorm) var 65% (19/29) i samme gruppe. I gruppene intubert med albendazol og morantel var det henholdsvis 7% (2/29) og 3% (1/30) uten bendelorm (kategori 1), og 41% (12/29) og 37% (11/30) i kategori 2. Kontingensanalysen viste at det er en signifikant forskjell mellom gruppene ($P < 0.0001$, appendix 2)

Figur 3. Resultater fra forsøk 2 vist som kontingensanalyse. Følgende kategorier: 1 = 0 bendelorm, 2 = 1 – 3 bendelorm, 3 = 3 – 9 bendelorm og 4 = 10 eller flere. K = Kontroll, A = Albendazol, F = Fenbendazol, FB = Fenbendazol – behandlet i felt og M = Morantel.



6.4. Synlige bivirkninger

Det ble ikke funnet fisk med synlige utvendige skader ved avslutning. Det ble registrert en død fisk i gruppen intubert med fenbendazol i forsøk 1, 2 dager etter intubering. Det ble konkludert med at denne hadde dødd som følge av skade på gjellene ved intubering.

6.5. Vekt

All fisk i forsøk 1 og 2 ble veid ved oppstart og avslutning. Det var bedre vekst i forsøk 1 enn i forsøk 2. Gruppene som ble intubert med morantel og oxfendazol hadde en vektøkning på hele 19 % i forsøk 1. I forsøk 2 hadde gruppen som ble behandlet i anlegget en vekst på 24.6 %. I samme forsøk var det negativ vekst (-7.3 %) i kontrollgruppen.

Tabell 6. Vektøkning etter 2 uker i forsøk 1 og 2. (% vektøkning = sluttvekt - startvekt / startvekt x 100)

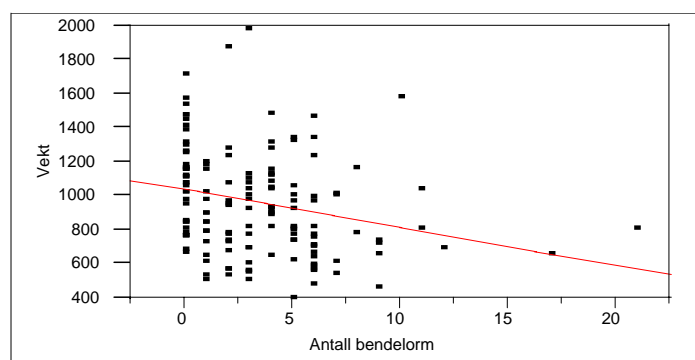
Behandlings- middel	Forsøk 1		Forsøk 2	
	% vektøkning	n	% vektøkning	n
Albendazol	10.2	30	3.8	29
Fenbendazol	17.6	29	4.8	28
Fenbendazol, utføret	-		24.6*	30
Morantel	19.4	30	1.3	30
Oxfendazol	19.4	27	-	
Praziquantel	16.2	30	-	
Kontroll	13.3	30	-7.3	30

* % vektøkning utregnet med utgangspunkt i at startvekt = gj.snitt for forsøksfisken ved start, n=120

6.6. Antall bendelorm i forhold til vekt

I forsøk 2 ble mage-pylorus-tarm fra hver fisk lagt i separate poser og merket. Dette gjorde det mulig å undersøke om det var sammenheng mellom vekt og antall bendelorm. Samtlige grupper tatt med. Dette ble også undersøkt separat for hver enkelt gruppe, og viste samme tendens i samtlige grupper. Det var statistisk signifikant sammenheng mellom vekt og antall bendelorm, dvs lavt antall bendelorm medførte høyere vekt enn ved høyt antall bendelorm (P=0.002) (Appendix 2).

Figur 4. Sammenheng mellom vekt og antall bendelorm i forsøk 2 (n=148)



6.7. Antall bendelorm ved avslutning i forsøk 3

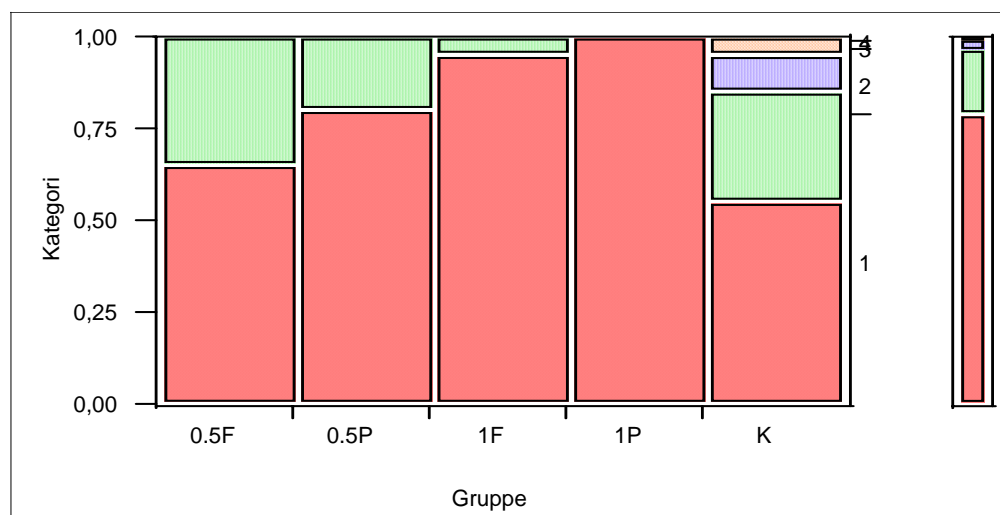
Forsøk 3 ble avsluttet 5 dager etter behandling. Det ble funnet bendelorm i 45 % (9/20) av fisken i kontrollgruppen. Fordi det er lavere prevalens i dette forsøket, er resultatet vist som prevalens i tabell 7 (- gjennomsnitt er tatt med, men dette er misvisende når en stor andel fisk ikke har bendelorm). Det ble ikke funnet noen fisk med bendelorm i gruppen intubert med hel dose praziquantel, men 20 % (4/20) i gruppen intubert med halv dose. Det ble funnet 1 fisk

med bendelorm i gruppen intubert med hel dose fenbendazol, og 35 % (7/20) i fisken intubert halv dose. Resultatet er vist i tabell 7, og figur 5.

Tabell 7. Antall bendelorm i fisken ved avslutning i forsøk 3

Gruppe	Prevalens (%)	Gj. snitt (infisert fisk)
Praziquantel, hel dose	0	-
Praziquantel, halv dose	20 (4/ 20)	1
Fenbendazol, hel dose	5 (1/ 20)	1
Fenbendazol, halv dose	35 (7/ 20)	1.43
Kontroll	45 (9/ 20)	4.1

Figur 5. Resultater fra forsøk 3 vist som kontingensanalyse. Følgende kategorier: 1 = 0 bendelorm, 2 = 1 – 3 bendelorm, 3 = 3 – 9 bendelorm og 4 = 10 eller flere. K = Kontroll, F = Fenbendazol, P = Praziquantel (1=hel dose, 0.5 = halv dose).



6.8. Bieffekter

Histologi fra magesekk samt området mellom pylorus og tynntarm ble tatt ut og lagt på 4 % formalin ved avslutning. Prøvene ble analysert ved Veterinærinstituttet, Bergen. Histopatologisk undersøkelse av det innsendte materialet viste varierende forekomst av granulomatøs peritonitt (- bukhinnebetennelse) i individer fra alle fem gruppene. Det ble ikke påvist andre patologiske forandringer i mage eller tarm. Det ble heller ikke påvist klare forskjeller mellom de ulike gruppene. **Diagnose** : Påvist peritonitt, noe som er en bivirkning etter vaksinerings.

7. Diskusjon

7.1. Forsøk 1

Ved intubasjon ble det registrert at vannet i oppvåkingskaret ble grumsete, uten at dette kunne knyttes til en bestemt fisk. Årsaken var trolig at noe av forsøksfôret (pastaen) "lakk" ut av fisken. Dette skjer trolig i forbindelse med bedøvelse der lukkemuskelen i svelget delvis lammes. På grunn av dette ble det bestemt å erstatte pastaen med pellet, og ikke å bruke bedøvelse under intuberingen ved forsøk 2.

Resultatet demonstrerte dårlig effekt av praziquantel, noe som viser at bendelormen i dette anlegget har nedsatt følsomhet overfor dette middelet. Dette stemmer godt overens med resultatet fra studien som ble gjort på et anlegg i nærheten. I den studien var det også dårlig effekt av enkel og dobbel dose praziquantel administrert ved intubasjon (Olav Breck, Marine Harvest, Elisabeth Aasum, Skretting, pers. med).

Det var ventet at oxfendazol skulle ha bedre effekt enn det resultatet i forsøk 1 viste. Oxfendazol er en sulfoksydmetabolitt av fenbendazol. Tentativ dose oxfendazol (5 mg/ kg) ble satt til halvparten av anbefalt dose fenbendazol (10mg/ kg), fordi oxfendazol er mer potent enn fenbendazol. Den mer potente effekten viste seg imidlertid ikke å kunne oppveie for den lavere doseringen. Oxfendazol og praziquantel var de behandlingsmidlene med dårligst virkning, og det ble bestemt at disse to midlene skulle kuttes ut i neste forsøk.

Morantel virker ikke på alle typer bendelorm. I dette forsøket hadde det en viss virkning, derfor er det grunn til å anta at også morantel hadde vært mer effektiv i en høyere dose.

Fisken hadde god vekst i de 2 ukene forsøket pågikk, på tross av at fisken gikk i en separat minimerd som ble håndfôret av røkterne på anlegget. Tilveksten var nest lavest i kontrollgruppen (13.8 %). Redusert vekst i denne gruppen kan skyldes høy infestasjon av bendelorm. Veksten var høyest for gruppen som ble gitt morantel og oxfendazol (19.4 %), og lavest for albendazol (10.2 %). I disse gruppene var det kun moderat effekt av legemidlene, dvs det var fortsatt bendelorm. Gruppene behandlet med praziquantel og fenbendazol hadde også god vekst i perioden, henholdsvis 16.2 og 17,6 %. Vekten var normalfordelt, noe som gjør det teoretisk mulig å benytte parametriske statistiske tester ved sammenligning av grupper. Dette er ikke gjort fordi forsøkene ble avsluttet etter 14 dager, og dette er for kort tid til at vekt skal være noe annet enn å vise en mulig trend. Fôring ble gjennomført med håndfôring, og ikke like regelmessig som ved automatisk fôring. All fisken fikk imidlertid samme tilgang til fôr, og appetitt gjenspeiler godt fiskens allmenntilstand.

7.2. Forsøk 2.

Det var best effekt i den gruppen som ble medisinerert med utfôret fenbendazol (Tabell 5). Denne gruppen hadde også den høyeste veksten (Tabell 6). Den undersøkte fisken ble tatt fra samme merd som forsøksfisken ble tatt fra 16 dager tidligere (merd 10). Fisken i denne merden fikk mer fôr og mer regelmessig fôring enn fisken i forsøksmerden. I forbindelse med denne medisineringen ble det registrert en betydelig appetittsvikt. Dette er vist i appendix 4. Anbefalt behandlingsregime er å fôre medisinfôret ut på 2 dager med 0.5 % utfôring pr dag. På grunn av appetittsvikt ble medisinfôret gitt i løpet av 3 dager. Den undersøkte fisken hadde en vekst på over 24 %. Det er mulig at fisken som ble undersøkt ikke representerte gjennomsnittet. Den kan ha spist mer av medisinfôret enn til sammen 1 %. Effekten av albendazol og morantel var ikke like god som i forsøk 1, men det viste samme tendens; albendazol hadde noe bedre effekt enn morantel.

I dette forsøket var det dårligere vekst sammenlignet med forsøk 1 (Tabell 6). I henhold til røkterne ble det fôret mindre og mer tilfeldig i dette forsøket. At kontrollgruppen reduserte sin vekt kan tyde på negative effekter av bendelorm. Gruppene behandlet med albendazol og morantel, hadde fortsatt høy infestasjon av bendelorm i tarmen, men bedre vekst enn kontrollgruppen. Best vekst var det i gruppen behandlet med fenbendazol (4.8 %). Dette kan skyldes at dette middelet reduserte antall bendelorm mest. Det ble demonstrert en sammenheng mellom vekt og antall bendelorm (Figur 4). Fisk med lav vekt hadde flere

bendelorm sammenlignet med fisk med høy vekt. Dette viser at bendelorm har negativ innvirkning på fiskens vekst.

7.3. Forsøk 3.

Praziquantel hadde bedre effekt enn fenbendazol, både ved hel og halv dose. Praziquantel er normalt mer effektivt enn fenbendazol (T. E. Horsberg, pers. med.). Fordi praziquantel hadde god effekt ble det besluttet å behandle anlegget med dette behandlingsmiddelet. Etter behandling ble fisken undersøkt av veterinær (Vet. Roy Hjelmeland). I denne undersøkelsen ble det funnet bendelorm i 20 % av fisken (8/ 40). Antall bendelorm i hver fisk ble ikke registrert. Dette tilsvarer en reduksjon på 55 % i forhold til funn i kontrollfisken i intubasjonsforsøket (9/ 20). Dette resultatet er ikke i samsvar med forventet effekt, og ikke like godt som ved behandling med fenbendazol på Varaldsøy. Siden intubasjon med praziquantel viste god effekt, kan den reduserte effekten under feltforhold skyldes dårlig appetitt, som har resultert i at en relativt stor andel fisk hadde utilstrekkelig opptak av medikamentet i løpet av de to dagene dette ble utført.

I dette forsøket ble det av praktiske årsaker kun benyttet 20 fisk i hver gruppe. Antall individer i hver gruppe var ikke ideell forhold til at prevalens var kun 45 %. Et antall på minimum 30 i hver gruppe hadde vært mer ideelt.

7.4. Generelt

Det ble ikke funnet bivirkninger i form av dårlig appetitt, utvendige skader eller dødelighet etter intubasjon (- unntatt 1 fisk i forsøk 1). Det er ikke anbefalt å behandle med fenbendazol når vanntemperaturen er under 10 °C. I disse forsøkene var vanntemperaturen over 10 °C samtlige dager med unntak av to dager i forsøk 2, der den var 9.9 °C. Ved intubasjon blir all fisken behandlet likt. Stresset etter håndtering har derfor formodentlig påvirket appetitten likt for alle gruppene. Etter fullskala utføring med fenbendazol ble det derimot påvist en markant appetittsvikt. Denne kan skyldes at fisken ikke likte smaken av fenbendazol, eller at dette midlet forårsaket skader i magesekk/tarm. Mage og tarm fra forsøk 3 ble undersøkt histopatologisk for bivirkninger etter behandling. Det ble ikke funnet bivirkninger i noen av gruppene. I et tidligere forsøk med fenbendazol ble det funnet bivirkninger i form av skader på tarm og magesekk (Olav Breck, Marine Harvest, pers. med).

I forsøk 1 ble forsøksfisken bedøvet og intubert pasta med behandlingsmiddel. I forsøk 2 ble fisken ikke bedøvet, og intubert pellet med behandlingsmiddel, mens den ble bedøvet og intubert pellet med behandlingsmiddel i forsøk 3. I første forsøk ble det registrert at noe av pastaen lakk ut av fisken sannsynligvis fordi bedøvelsesmidlet delvis lammer lukkemuskelen i svelget. Det ble imidlertid registrert kun 2 – 3 pellet totalt i oppvåkningskaret i forsøk 3. Lekkasje var ikke noe problem på tross av bedøving når det ble intubert pellet.

Gjennomsnittlig antall bendelorm i kontrollfisk i forsøk 1 var 6.5, mens den ble registrert til å være 6.0 i forsøk 2. Dette gjenspeiler en viss unøyaktighet i registrering av antall bendelorm. Registrering av 0 - 3 bendelorm utføres nøyaktig, men når antallet bendelorm er høyere, avtar nøyaktigheten gradvis. Kontingensanalyse skal benyttes fordi antall bendelorm etter behandling ikke er normalfordelt, og det er varierende prevalens i gruppene (Stig Larsen, pers. med), men også fordi kategoriene (eks.: 0, 1-3, 4 – 9, 10+), gjenspeiler graden av nøyaktighet.

8. Utvikling av bioassay

8.1. Innsamling av bendelorm

Det ble forsøkt ulike metoder for å samle inn bendelorm. Mage-pylorus-tarm ble tatt ut av fisken, og klippet opp på langs. Deretter ble det forsøkt å løsne bendelorm med pinsett. Dette var umulig, fordi det var flere bendelorm i hver mage-tarmpakke. Enkeltindividene var infiltrert i hverandre samtidig som deler var krøllet sammen inne i blindsekker. Det var derfor vanskelig å isolere enkeltindivider. I de tilfellene der enkeltindivider ble isolert, og forsøkt løsnet med pinsett, røyk bendelormen og scolex ble sittende igjen i blindsekken. Etter en tids prøving å feiling viste det seg at den beste (- og eneste) metoden var å legge oppklippede mage/tarmpakker i fysiologisk saltvann 1 – 3 timer, og deretter samle inn bendelorm som hadde løsnet av seg selv.

8.2. Overlevelse i medium

Ved valg av medium for gjennomføring av bioassay, må det tas hensyn til at mediet kan binde behandlingsmiddel slik at den effektive konsentrasjonen er lavere enn beregnet. Det er derfor gunstig å bruke et medium med lite oppløste stoffer. Det ble derfor utført bioassay med fysiologisk saltvann. Bendelorm i kontrollgruppen overlevde 12 timer, men var svekket eller død ved 24 timer. Det ble derfor gjennomført bioassay der respons ble evaluert etter 12 timers eksponering.

8.3. Gjennomføring av bioassay

Det ble gjennomført i alt 4 bioassay med praziquantel. Det første ble gjennomført med oppklippede mager, og ble evaluert ved 1, 6, 12 og 24 timer. I kontrollgruppen ble det registrert at bendelorm løsnet fra tarmveggen etter en viss tid. Det var ikke mulig å evaluere respons i dette bioassayet nøyaktig.

Praziquantel løses dårlig i vann, men godt i etanol. Stamlløsningen 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. 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. Individuer uten bevegelse, selv etter berøring, ble klassifisert som døde.

Tabell 8. 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)

8.4. Resultater

Følsomheten 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).

Resultater fra 3 bioassay er vist i tabell 9. Det viste seg at bendelorm fra Varaldsøy som er antatt resistent overfor praziquantel hadde høyere LD₅₀ enn bendelormen fra Syltøy. Det betyr at det er nødvendig med høyere dose praziquantel for å drepe bendelormen fra Varaldsøy. Dette er i samsvar med det som ble forventet, og kan antyde at bioassayet fungerer. Ved estimering av LD₅₀ ble konfidensintervall ikke beregnet. Årsaken er at det er benyttet for få individer i testene. Dersom de to testene som er utført på Varaldsøy slås sammen, blir antallet stort nok til at 90 % konfidensintervall beregnes, LD₅₀ = 6.28 ppb, 90 % konf. Int. = 1.72 – 28.0. Det er nødvendig å gjennomføre flere bioassay der antallet individer er høyere, minimum 10 i hver gruppe, og legge til en ekstra dose på 50 ppm. Det er også nødvendig å undersøke om følsomheten er størrelsesavhengig, dvs sammenligne små og store individer. Dersom det er tilfelle, må bioassayet standardiseres med en størrelsesgruppe.

Tabell 9. Resultater fra bioassay med praziquantel og bendelorm (*Eubothrium* sp.), evaluert etter 12 timer eksponering

Konsentrasjon	Respons (levende / døde)		
	1. bioassay *	2. bioassay *	3. bioassay**
0 (kontr.)	5 / 0	5 / 0	6 / 0
100 ppb (0.1 ppm)	7 / 1	7 / 0	6 / 2
1.0 ppm	7 / 1	5 / 0	2 / 10
10 ppm	3 / 5	4 / 2	2 / 7
100 ppm	0 / 7	0 / 8	0 / 9
LD ₅₀ (ppm)	3.96	7.99	0.28

* bendelorm innsamlet på Varaldsøy

** bendelorm innsamlet på Syltøy

9. Konklusjoner

- Studie 1
- Bendelormen i dette anlegget har nedsatt sensitivitet (resistens) overfor praziquantel.
 - Fenbendazol er det alternative behandlingsmiddelet med best effekt av de undersøkte alternative midlene, men albendazol og morantel er også aktuelle kandidater.
- Studie 2
- Fenbendazol er det alternative behandlingsmiddelet med best effekt
 - Feltbehandling med fenbendazol ga bedre effekt enn intubasjon
 - Ved feltbehandling med fenbendazol ble appetitten redusert
- Studie 3
- Intubasjon med praziquantel har god effekt på antatt sensitiv bendelorm
 - Bieffekt: (praziquantel – fenbendazol) – kontroll ???
- Bioassay
- Eneste måten å få løst hele bendelorm på er å la oppklippede mage/tarmpakker ligge i fysiologisk saltvann, og bruke individer som løser i bioassay.
 - Bioassay kan gjennomføres i fysiologisk saltvann og avleses etter 12 timer
 - Må standardiseres ytterligere: Undersøke følsomhet i forhold til størrelse, og justere konsentrasjoner

10. Videre arbeid

Dette var et pilotprosjekt. Prosjektet hadde begrenset tid (5 mnd). Det medførte at undersøkelsene måtte konsentrere seg om behandlingsmidler som var enkle å få tak i, dvs de som var i bruk i Norge. De alternative behandlingsmidlene ble testet ut i anbefalte doser. Fenbendazol hadde god effekt, ikke minst ved utfôring i studie 2. De andre midlene, albendazol, morantel og oxfendazol hadde begrenset effekt, men det er aktuelt å teste effekt av høyere dose med disse midlene.

Det er en rekke midler som har effekt på cestoder, tabell 10. Det vil være svært kostnadskrevenende å teste disse ut med intubasjon i felt. Dersom et *in vitro* bioassay ble utviklet og standardisert ferdig, kan dette benyttes til å undersøke effekt av samtlige midler. De med best effekt kan deretter testes ut i felt, først med intubasjon, deretter med utfôring. Et bioassay vil også være et viktig verktøy i kartlegging av resistens og undersøke følsomheten i oppdrettsanlegg som planlegger behandling.

Mekanismer som fører til resistens er: a) metabolsk detoksifisering (eks. cytochrom P450 monooksygenase eller andre enzymer), b) endret virkested (- endrede Ca-kanaler) og c) p-glycoprotein (reduisert gjennomtrengelighet av integument) (Philip Jewess, IACR Rothamstead, pers.med.). Mekanismen som allerede har ført til resistens mot praziquantel i bendelorm kan være økt metabolsk detoksifisering. Dette kan relativt enkelt undersøkes ved å eksponere bendelorm med praziquantel i kombinasjon med enzymhemmere som piperonylbutoksyd (PBO).

Tabell 2. Aktuelle alternative behandlingsmidler til praziquantel - parasittmidler mot bendelorm og trematoder (ikter) (Veterinary Drug Handbook, 2002)

Middel	Type	Produsent	Prep. Navn	MRL
Albendazol	Benzimidazol	Pfizer	Valbazen	Ja
Clorzulon	Benzenesulfonamide	Merial	Curatrem	Ja
Dichlorvos	Org. Fosfat	Boeringer I.	Prozap	Ja
Diethylcarbazine	DEC	Pfizer	Filaribits	Ja
Epsiprantel	Pyrazino-benzapine	Pfizer	Cestex	Nei
Fenbendazole	Benzimidazol	Intervet	Panacur	Ja
Fenthion	Org.fosfat	Bayer	Tiguvon	Ja
Morantel	Tetrahydropyrimidin	Pfizer	Nematel	Ja
Oxfendazole	Benzimidazol	Coopers	Systemex	Ja
Oxibendazole	Benzimidazol	Pfizer	Anthelcide	Ja
Pyrantel	Pyrimidin-derivat	Pfizer	Strongid	Ja
Thiabendazole	Benzimidazol	Merck	Mintezol (human)	Ja

Viktige punkter i videre arbeid vil derfor være:

1. Undersøke effekt av høyere doser med morantel og oxfendazol via intubasjon av fisk med bendelorm.
2. Undersøke effekt av praziquantel i kombinasjon med enzymhemmeren pipronylbutoksyd (PBO).
3. Fortsette utvikling og standardisering av et *in vitro* bioassay.
4. Undersøke effekt av alternative behandlingsmidler (tabell 10) med bioassay.
5. Undersøke effekt og bieffekt av utvalgte alternative behandlingsmidler med intubasjon i felt.
6. Undersøke effekt og bieffekt av utvalgte alternative behandlingsmidler utfôring i felt.

7. Utarbeide en praktisk veiledning for bruk av alternative middel.
8. Kartlegge resistens ved å teste bendelorm fra utvalgte lokaliteter.
9. Undersøke mekanismer med et *in vitro* bioassay.

11. 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.

Plumb D C (2002) Veterinary Drug Handbook (4th Edition). Iowa State Press, Ames Iowa, USA.

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.

Appendix 1

Resultater fra forsøk 1

Kontingenstabellen viser fordeling av fisk innefor de ulike kategoriene (Figur 2) i forsøk 1. Følgende kategorier: 1 = 0 bendelorm, 2 = 1 – 3 bendelorm, 3 = 3 – 9 bendelorm og 4 = 10 eller flere. K = Kontroll, A = Albendazol, F = Fenbendazol, P = Praziquantel, O = Oxfendazol og M = Morantel.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	4	
A	6 3,41 33,33 20,00	16 9,09 19,51 53,33	7 3,98 10,94 23,33	1 0,57 8,33 3,33	30 17,05
F	3 1,70 16,67 10,34	23 13,07 28,05 79,31	3 1,70 4,69 10,34	0 0,00 0,00 0,00	29 16,48
K	1 0,57 5,56 3,33	5 2,84 6,10 16,67	19 10,80 29,69 63,33	5 2,84 41,67 16,67	30 17,05
M	5 2,84 27,78 16,67	12 6,82 14,63 40,00	13 7,39 20,31 43,33	0 0,00 0,00 0,00	30 17,05
O	1 0,57 5,56 3,70	11 6,25 13,41 40,74	11 6,25 17,19 40,74	4 2,27 33,33 14,81	27 15,34
P	2 1,14 11,11 6,67	15 8,52 18,29 50,00	11 6,25 17,19 36,67	2 1,14 16,67 6,67	30 17,05
	18 10,23	82 46,59	64 36,36	12 6,82	176

Source	DF	-LogLike	RSquare (U)
Model	15	24,61684	0,1227
Error	158	176,02328	
C. Total	173	200,64012	
N	176		

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Likelihood Ratio	49,234	<.0001
Pearson	44,885	<.0001

Warning: 20% of cells have expected count less than 5, ChiSquare suspect

Appendix 2

Resultater fra forsøk 2, antall bendelorm etter behandling

Kontingenstabellen viser fordeling av fisk innefor de ulike kategoriene (Figur 2) i forsøk 2. Følgende kategorier: 1 = 0 bendelorm, 2 = 1 – 3 bendelorm, 3 = 3 – 9 bendelorm og 4 = 10 eller flere. K = Kontroll, A = Albendazol, F = Fenbendazol, F = Fenbendazol – behandlet i felt og M = Morantel.

Count Total % Col % Row %	1	2	3	4	
A	2 1,35 5,26 6,90	12 8,11 25,53 41,38	14 9,46 24,56 48,28	1 0,68 16,67 3,45	29 19,59
F	9 6,08 23,68 31,03	19 12,84 40,43 65,52	1 0,68 1,75 3,45	0 0,00 0,00 0,00	29 19,59
FB	26 17,57 68,42 86,67	4 2,70 8,51 13,33	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	30 20,27
K	0 0,00 0,00 0,00	1 0,68 2,13 3,33	26 17,57 45,61 86,67	3 2,03 50,00 10,00	30 20,27
M	1 0,68 2,63 3,33	11 7,43 23,40 36,67	16 10,81 28,07 53,33	2 1,35 33,33 6,67	30 20,27
	38 25,68	47 31,76	57 38,51	6 4,05	148

Source	DF	-LogLike	RSquare (U)
Model	12	72,04474	0,4020
Error	133	107,15299	
C. Total	145	179,19773	
N	148		

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Likelihood Ratio	144,089	<.0001
Pearson	130,469	<.0001

Warning: 20% of cells have expected count less than 5, ChiSquare suspect

Resultat fra forsøk 2, sammenheng mellom vekt og antall bendelorm

Linear Fit

Vekt = 1036,1907 - 22,287051 Antall bendelorm

Summary of Fit

RSquare	0,063566
RSquare Adj	0,057152
Root Mean Square Error	288,9995
Mean of Response	962,1014
Observations (or Sum Wgts)	148

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	13	2006436	154341	2,0149
Pure Error	133	10187588	76598	Prob > F
Total Error	146	12194023		0,0240
				Max RSq
				0,2176

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	827738	827738	9,9106
Error	146	12194023	83521	Prob > F
C. Total	147	13021761		0,0020

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1036,1907	33,43959	30,99	<.0001
Antall bendelorm	-22,28705	7,07951	-3,15	0,0020

Appendix 3

Resultater fra delstudie 3

Kontingenstabellen viser fordeling av fisk innefor de ulike kategoriene (Figur 2) i forsøk 2. Følgende kategorier: 1 = 0 bendelorm, 2 = 1 – 3 bendelorm, 3 = 3 – 9 bendelorm og 4 = 10 eller flere. K = Kontroll, F = Fenbendazol, P = Praziquantel (1=hel dose, 0.5 = halv dose).

Count Total % Col % Row %	1	2	3	4	
0.5F	13 13,00 16,46 65,00	7 7,00 38,89 35,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	20 20,00
0.5P	16 16,00 20,25 80,00	4 4,00 22,22 20,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	20 20,00
1F	19 19,00 24,05 95,00	1 1,00 5,56 5,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	20 20,00
1P	20 20,00 25,32 100,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	0 0,00 0,00 0,00	20 20,00
K	11 11,00 13,92 55,00	6 6,00 33,33 30,00	2 2,00 100,00 10,00	1 1,00 100,00 5,00	20 20,00
	79 79,00	18 18,00	2 2,00	1 1,00	100

Statistiske beregninger

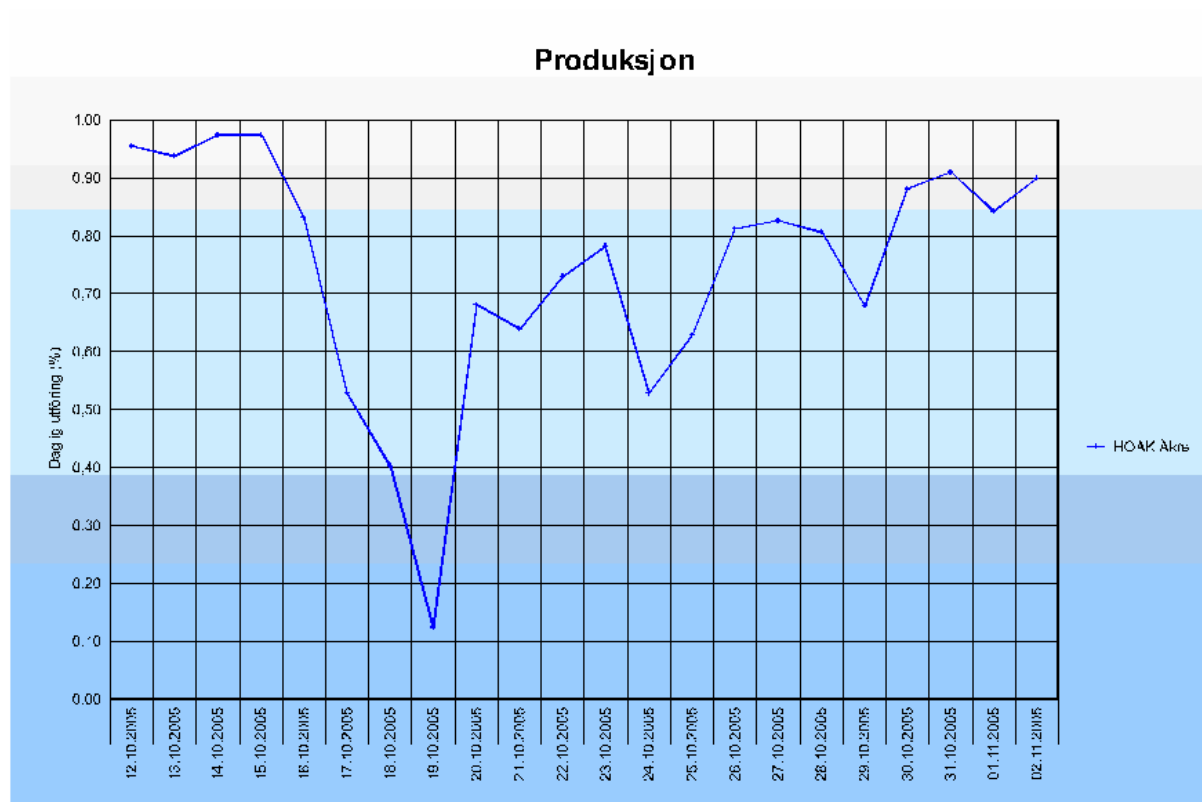
Source	DF	-LogLike	RSquare (U)
Model	12	13,589420	0,2195
Error	85	48,328232	
C. Total	97	61,917652	
N	100		

Test	ChiSquare	Prob>ChiSq
Likelihood Ratio	27,179	0,0073
Pearson	26,055	0,0105

Warning: 20% of cells have expected count less than 5, ChiSquare suspect

Appendix 4

Appetitt etter behandling med fenbendazol



Fisken ble sultet fra 15.10, og utfôring av fenbendazol startet 17.10, og ble avsluttet 19.10.

Appendix 5 Resultater fra histologi (forsøk3) Journalnummer: F370/05

Fisk nr.	Organer i snitt			Mavesekk					Tarm				
	V	I	P	Gr. perit	Epitel	Submucosa	Muscularis	EGC	Gr. perit	Epitel	Submucosa	Muscularis	EGC
1-1	X	X	X	3	0	0	0	0	3	0	1 degen foci 1 gr perit	1 celleinfiltr gr perit	2 refr
1-2	X	X	-	0	0	1 celleinfiltr	0	0	0	2 nekr	1 celleinfiltr	0	0
1-3	X	X	X	2	0	0	0	0	3	1 IEL/nekr	0	0	1 refr
1-4	X	X	X	3	0	0	0	0	0	1 IEL/nekr	0	0	0
1-5	X	X	X	3	0	1-2 celleinfiltr, gr perit	1 celleinfiltr gr perit	0	0	1 IEL	1 degen foci	0	0
2-1	X	X	X	3	1 IEL	0	0	0	2	1 IEL	1 degen foci	0	1 refr
2-2	X	X	X	1	0	1 celleinfiltr	0	0	2	1 degen/nek 1-2 IEL	0	0	0
2-3	X	X	-	1	0	1 celleinfiltr	0	0	1	2 IEL 1 degen/nek	1 celleinf 1 degen foci	0	0
2-4	X	X	-	1	0	0	0	1refr	1	1 IEL	1 degen foci?	0	1 refr
2-5	X	X	X	2	0	0	0	1refr	0	1 IEL 1 PM?	1 degen foci?	0	1 refr

Praziquantel, hel dose: 1-1 til 1-5, praziquantel, halv dose: 2-1 til 2-5, fenbendazol, hel dose: 3-1 til 3-5, fenbendazol, halv dose: 4-1 til 4-5, kontroll: 5-1 til 5-5. Fisk registreres med delprøve- og individnummer. Forandringer registreres med en skala fra 0 til 3, hvor 0 er normalt/ingen forandringer, 1 lite, 2 moderat og 3 uttalt. Forkortelser: Gr perit = granulomatøs peritonitt (vaksineskade). IEL = intraepiteliale lymfocytter. Degen foci = små områder m degenererte celler. Nekr = nekrotiske cellekjerener. Celleinfiltr = forøket mengde cellekjerener i vevet. EGC = eosinofile granulære celler. Refr = tendens til degranulering av EGC. PM = postmortelle forandringer.

Journalnummer: F370/05

Fisk nr.	Organer i snitt			Mavesekk					Tarm				
	V	I	P	Gr. perit	Epitel	Submucosa	Muscularis	EGC	Gr. perit	Epitel	Submucosa	Muscularis	EGC
3-1	X	X	X	0	0	0	0	0	1-2	1 IEL 1 PM?	1 degen foci?	0	0
3-2	X	X	-	2	1 IEL	0	0	0	1	1 IEL 1 nekr	1 degen foci?	0	0
3-3	X	X	X	1-2	0	1 ødem? 1 celleinfiltr	0	0	1-2	2 IEL 1 nekr	1 degen foci?	0	1 refr
3-4	X	X	X	1	0	0	0	0	2-3	1 IEL 2 nekr?PM?	1 celleinfiltr	0	1-2 refr
3-5	X	X	X	0-1	0	1 celleinfiltr	0	0-1 refr	1-2	1 IEL 2 nekr?PM?	1 degen foci?	0	1-2 refr
4-1	X	X	-	0	1 IEL	0	0	0	0	2 IEL 1 nekr	1 degen foci?	0	1 refr
4-2	X	X	-	0	1 IEL	0	0	0	0	1 IEL	1 degen foci?	0	0
4-3	X	X	X	3	0	0	2 celleinfiltr gr perit	0	0-1	1 IEL 1 nekr	0	0	0
4-4	X	X	X	1	0	1 degen? Under str.comp	0	1 refr	1-2	1 IEL 1 nekr	1 degen foci?	0	1 refr
4-5	X	X	-	2	0	0	0	0	2	1 IEL 1 nekr	0	0	1 refr

Praziquantel, hel dose: 1-1 til 1-5, praziquantel, halv dose: 2-1 til 2-5, fenbendazol, hel dose: 3-1 til 3-5, fenbendazol, halv dose: 4-1 til 4-5, kontrol: 5-1 til 5-5. Fisk registreres med delprøve- og individnummer. Forandringer registreres med en skala fra 0 til 3, hvor 0 er normalt/ingen forandringer, 1 lite, 2 moderat og 3 uttalt. Forkortelser: Gr perit = granulomatøs peritonitt (vaksineskade). IEL = intraepiteliale lymfocytter. Degen foci = små områder m degenererte celler. Nekr = nekrotiske cellekjerner. Celleinfiltr = forøket mengde cellekjerner i vevet. EGC = eosinofile granulære celler. Refr = tendens til degranulering av EGC. PM = postmortelle forandringer.

Journalnummer: F370/05

Fisk nr.	Organer i snitt			Mavesekk					Tarm					
	del ind.	V	I	P	Gr. perit	Epitel	Submucosa	Muscularis	EGC	Gr. perit	Epitel	Submucosa	Muscularis	EGC
5-1	X	X	X		3	1 degen/nek	2 celleinfiltr	0	0	0	1 IEL 1 nekr	1-2 degen foci / celleinf?	0	0
5-2	X	X	X		2	0	2 celleinfiltr	1 celleinfiltr gr perit?	0	1-2	1 nekr PM?	0	0	1 refr
5-3	X	X	-		3	0	1 celleinfiltr	0	1 refr	3	1 nekr/IEL 1 PM	1 celleinfiltr	0	1 refr
5-4	X	X	X		3	0	1-2 celleinfiltr	1 celleinfiltr gr perit	1 refr	-	0		-	-
5-5	X	X	X		1-2	0		0	0	3	0	1 celleinfiltr 1 degen foci	0	1 refr

Praziquantel, hel dose: 1-1 til 1-5, praziquantel, halv dose: 2-1 til 2-5, fenbendazol, hel dose: 3-1 til 3-5, fenbendazol, halv dose: 4-1 til 4-5, kontrol: 5-1 til 5-5. Fisk registreres med delprøve- og individnummer. Forandringer registreres med en skala fra 0 til 3, hvor 0 er normalt/ingen forandringer, 1 lite, 2 moderat og 3 uttalt. Forkortelser: Gr perit = granulomatøs peritonitt (vaksineskade). IEL = intraepiteliale lymfocytter. Degen foci = små områder m degenererte celler. Nekr = nekrotiske cellekjerner. Celleinfiltr = forøket mengde cellekjerner i vevet. EGC = eosinofile granulære celler. Refr = tendens til degranulering av EGC. PM = postmortelle forandringer.