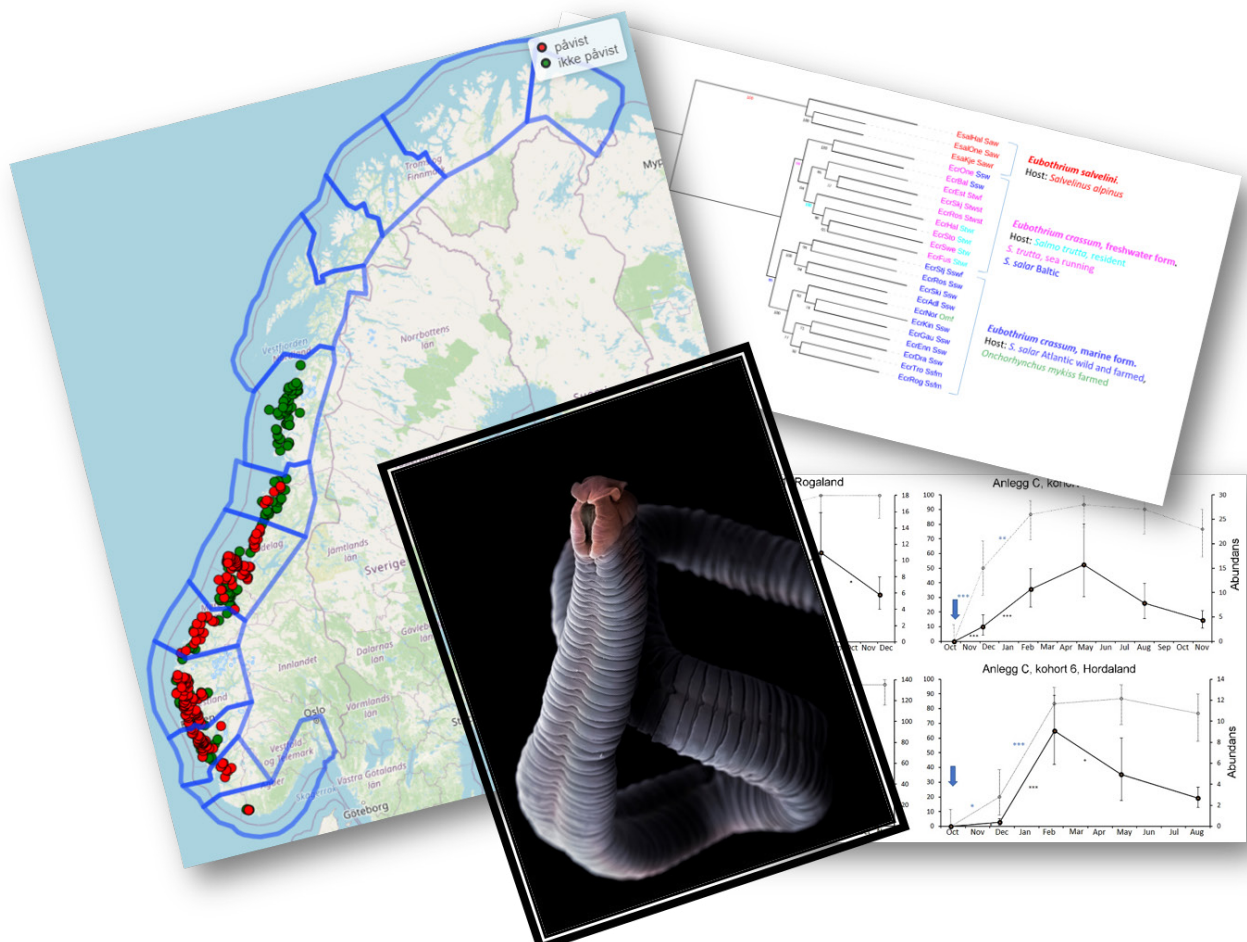




Infeksjoner med bendelormen *Eubothrium* sp. i oppdrettsanlegg i Norge: resistens, utbredelse og påvirkning på fiskehelsen



Infeksjoner med bendelormen *Eubothrium* sp. i oppdrettsanlegg i Norge: resistens, utbredelse og påvirkning på fiskehelsen

Forfattere

Haakon Hansen¹, Egil Karlsbakk², Christoph Hahn³, Lars Qviller¹, Bjørn Spilsberg¹, Trine Sakariassen⁴, Kristian Ruud² og Sigmund Sevatdal⁵.

¹Veterinærinstituttet, ²Universitetet i Bergen, ³Universitetet i Graz, Østerrike, ⁴Universitetet i Tromsø, ⁵VESO AS

Forslag til sitering

Hansen, H., Karlsbakk, E., Hahn, C., Qviller, L., Spilsberg, B., Sakariassen, T., Ruud K., og Sevatdal S. (2022) Infeksjoner med bendelormen *Eubothrium* sp. i oppdrettsanlegg i Norge: resistens, utbredelse og påvirkning på fiskehelsen. VI-rapport 23, 2022. Veterinærinstituttet. © Veterinærinstituttet, kopiering tillatt når kilde gjengis

Kvalitetssikret av

Edgar Brun, Avdelingsdirektør, Veterinærinstituttet

Publisert

2022 på www.vetinst.no

ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)

© Veterinærinstituttet 2022

Oppdragsgiver eller Samarbeidspartner

Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)



Kolofon

Design omslag: Reine Linjer

Foto av *Eubothrium crassum* på forside: Jannicke Wiik-Nielsen

www.vetinst.no

Innhold

1	Summary	3
2	Sammendrag	6
3	Hovedfunn	8
4	Innledning	9
5	Problemstilling og formål	11
6	Prosjektorganisering	12
7	Gjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon fra de forskjellige deler av prosjektet.	13
7.1	Del 1: Den geografiske utbredelse til <i>Eubothrium</i> sp. og til populasjoner av parasitten som er resistente mot praziquantel.	13
7.2	Del 2: Diagnostikk, populasjonsgenetikk og genomikk	22
7.3	Del 3: Påvirkningen av infeksjoner med <i>Eubothrium</i> sp. på veksten og helsen til fiskeverten.....	35
7.4	Del 4: Behandlingsprosedyrer	54
8	Avvik fra opprinnelig prosjektplan	58
9	Leveranser	59
10	Referanser	60
11	Takk	63
12	Liste over figurer	64
13	Liste over tabeller	66
14	Appendiks	68
14.1	Appendiks 1: Detaljert beskrivelse av DNA-ekstraksjon, genomsekvensering og bioinformatikk (på engelsk).....	68

1 Summary

Infections with tapeworms in the genus *Eubothrium* have been a recurring problem in Norwegian salmon farming for many years. Infections with *Eubothrium* sp. can have negative effects by affecting the health and growth of the salmon and the fish have therefore been treated with drugs added in the feed, mostly praziquantel (PZQ). Prior to the start of this project in 2017, there were an increasing number of reports and concerns about the possible development resistance in tapeworms to PZQ in Norwegian aquaculture. Breeders observed that treatments with PZQ did not give the expected results and there was a corresponding large increase in sales of the drug from 2010 to 2015. After 2015, however, sales of PZQ decreased significantly and sales have been low in recent years without a decrease in infections and related problems. Infections with *Eubothrium* sp. in seawater farmed salmonids seems to be becoming more common in some production areas (PO), especially PO2 and PO3, but little research has been done on the cestode in salmon in recent years. There was therefore a need for an increased research effort with a focus on this parasite in farmed fish. This project focused on four main parts: genetic studies with regard to whether there are different varieties and species in Norwegian farmed salmon; the distribution of tapeworms in Norwegian seawater farmed salmonids and occurrence of resistance; infection dynamics in farmed salmon and the impact such tapeworm infections have on the health and growth of farmed salmon; and finally, an evaluation of which treatment strategies are the best.

Genetic analyses

As the first project in the world the project has sequenced and annotated the genome of *Eubothrium crassum* from salmon and trout and of the related species *E. salvelini* from char, *Salvelinus alpinus*. Based on the genetic data, it was shown that tapeworms in the genus *Eubothrium* infecting fish in the Norwegian aquaculture industry, in both freshwater and saltwater, belong to the same species, namely *Eubothrium crassum*. However, there is evidence suggesting that the species can be divided into two genetic groups, one linked to freshwater and one marine form.

The mechanism of action of praziquantel in flatworms is on ion channels in the cells and the genetic basis for this has recently been characterized. The project has through analyzes of the genomic data shown that the genes encoding the proteins forming the ion channels are also present in *E. crassum* and this knowledge can be used to study this further and to develop molecular markers to study resistance.

The project has also developed a non-lethal method for detecting tapeworm infections from swab samples taken from the anal opening. The real-time PCR assays developed for this purpose also provides improved diagnostics of *Eubothrium crassum*.

The distribution of Eubothrium crassum in the Norwegian aquaculture industry

Through empirical data obtained from a survey distributed to the fish health services, the project demonstrated that *Eubothrium crassum* is widespread in the Norwegian aquaculture industry north to 65 degrees latitude. The parasite appears to be totally absent in production area 8 (PO8) and is less common in PO7 than in the production areas further south. The reason for the absence of the parasite in farmed fish in the sea in the northern parts of Norway may

be due to a lack of suitable intermediate hosts (copepods), and it is also discussed whether the declining occurrence northwards may be associated with lower farmed density.

Impact on health and growth

The cohort study and infection dynamics

An extensive cohort study was carried out within the project. Altogether 13 cohorts, stocked in the sea in areas with high infection pressure and at different times of the year (spring and autumn), were examined to assess the infection dynamics. Through this study, it was found that fish stocked in the sea in the spring remained uninfected for a longer period than fish stocked in late summer or autumn. The first group remained uninfected for several months, while fish stocked in the sea in late summer and autumn become infected almost immediately after transfer to seawater. However, most fish in both groups became infected with tapeworms during the study period. Based on the results, the infections seems to occur in May to February with the highest infection pressure in the autumn (August - December). This pattern of infection probably corresponds to the availability of infected intermediate hosts (copepods). In additions to the temporal variation in infection pressure, the degree of infection also depended on fish size. Almost no newly established larvae (plerocercoids) were found in the intestinal tract of fish longer than 30 cm, and very few juvenile tapeworms (<1 cm) were detected in fish larger than 40 cm. This is probably because the gill rakers of the fish have become too large to filter out the copepods and/or that larger fish are less prone to graze on copepods than smaller fish.

Impact on growth and feed consumption

Analyses of the influence of tapeworm infection on growth and feed consumption was carried out based on the result from the survey and available data from the aquaculture industry obtained through *Havbruksdata*. Through this, it was found that fish groups with few infected fish did not differ significantly from uninfected groups in terms of growth, while fish groups with a medium or high proportion of infected fish demonstrated significantly poorer growth. Uninfected groups and groups with a low proportion of infected fish had a lower feed consumption than fish groups where a larger proportion of the fish were infected. The results also indicate that the fish can compensate for the negative effects of tapeworm infections by eating more feed.

Resistance

Resistance testing against praziquantel with bioassay was not performed in the project due to the Covid 19 pandemic. The survey also provided too little data to conclude on resistance.

Treatment regime in relation to infection dynamics and life cycle

As the medication trial of the project could not be carried out, knowledge from the other parts of the project, primarily from the cohort study, and from other studies, was compiled into a best practice for treatment. The results from the cohort study show that both fish exposed in the autumn and spring become infected, but that fish exposed in the autumn become infected faster and with more parasites (higher abundance). The infection pressure is highest in late summer and autumn and low in winter-spring. The biggest risk factor for infection is the size of the fish, and small fish become infected faster and with higher abundance than larger fish. Few fish larger than 30 cm become infected, and are not re-infected after treatment (own observations). As copepod intermediate hosts are most common near the surface, shielding (skirt or snorkel) in the first period after stocking in the sea will reduce infections. The size of the fish is also important for choosing the best time of

treatment. It is recommended to treat when the fish has reached 30 cm length, as reinfections will largely be avoided. It will be most profitable to carry out treatment as soon as possible after reaching this size. This is also beneficial as small fish need less medicine than large fish to obtain the recommended dose (mg medicine/kg fish). This strategy will also provide a longer growth period with efficient utilization of the feed after treatment, which provides the best profitability.

2 Sammendrag

Infeksjoner med bendelorm i slekten *Eubothrium* har vært et problem i norsk lakseoppdrett gjennom mange år. For en oppdretter kan infeksjoner med *Eubothrium* sp. i sjøfasen ha negative effekter ved å påvirke helse og veksten til laksen og en har derfor behandlet fisken med legemidler i fôret, for det meste praziquantel (PZQ). De siste årene før oppstarten av dette prosjektet i 2017 var det et økende antall rapporter om og bekymringer for, mulig utvikling av resistens hos bendelorm mot PZQ i norsk havbruk. Oppdrettere så i økende grad at behandling med PZQ ikke ga forventet resultat og det var en stor økning i salget av legemiddelet fra 2010 til 2015. Etter 2015 sank imidlertid salget av PZQ markant uten at problemene med bendelorm så ut til å avta og salget har vært lavt de siste årene. Selv om infeksjoner med *Eubothrium* sp. i sjøoppdrett ser ut til å bli stadig mer vanlig forekommende i enkelte produksjonsområder (PO), spesielt PO2 og PO3, er det utført lite forskning på *Eubothrium* sp. i laks de siste årene. Det var derfor behov for økt forskningsinnsats knyttet til denne parasitten og effekten den har på oppdrettsfisk. Dette prosjektet ble derfor startet opp for å gi økt kunnskap om bendelorminfeksjoner i norsk oppdrettsnæring. Prosjektet fokuserte på fire hoveddeler: genetiske studier med hensyn på om det finnes forskjellige varianter og arter i norsk oppdrettslaks; utbredelsen til bendelorm i norsk oppdrett og utbredelse av resistens; infeksjonsdynamikk i oppdrettslaks og påvirkningen slike bendelorminfeksjoner har på helsen og veksten til oppdrettslaks; og til slutt hvilke behandlingsstrategier som er de beste.

Genetiske analyser

Prosjektet har som det første i verden sekvensert og annotert genomet til *Eubothrium crassum* fra laks og ørret og til arten *E. salvelini* fra røye, *Salvelinus alpinus*. Basert på de genetiske dataene blir det her vist at bendelorm i slekten *Eubothrium* i norsk oppdrettsnæring er én og samme art i både ferskvann og saltvann, nemlig *Eubothrium crassum*. Det er imidlertid mye som tyder på at arten kan deles inn i to genetiske grupper, én knyttet til ferskvann og én marin form.

Virkemekanismen til praziquantel hos flatormer er på ione-kanaler i cellene og den genetiske basisen for dette er nylig karakterisert. Prosjektet har gjennom analyser av de genomiske data påvist at gener som koder for proteinene som danner disse ione-kanalene også finnes i *E. crassum* og denne kunnskapen kan brukes til å studere dette videre og til utvikle molekylære markører for å studere resistens.

Prosjektet har også utviklet en ikke-letal metode for å påvise bendelorminfeksjoner fra svaberprøver fra gattet til fisk. Sanntids-PCR-metodikken som ble utviklet til dette formålet gir også bedret diagnostikk av *Eubothrium crassum*.

Utbredelsen til Eubothrium crassum i norsk oppdrettsnæring

Empiriske data innhentet fra en spørreundersøkelse sendt ut til fiskehelsetjenestene, viser at *Eubothrium crassum* er utbredt i norsk oppdrettsnæring nord til 65 grader nordlig bredde. Parasitten synes totalt fraværende i PO8 og er også mindre vanlig forekommende i PO7 enn i produksjonsområdene lengre sør. Fraværet av parasitten i oppdrettsfisk i sjø de nordlige deler av Norge skyldes sannsynligvis mangel på egnede mellomverter, og det diskuteres også om minkende forekomst nordover kan være assosiert med lavere oppdrettstetthet.

Påvirkning på helse og vekst

Kohortstudien og infeksjonsdynamikk

Det ble i prosjektet gjennomført en omfattende kohortstudie av 13 laksekohorter, satt ut vår eller høst, i områder med høyt smittepress av bendelormen *Eubothrium crassum*. Fisken ble undersøkt med henblikk på bendelormens smittedynamikk. Denne studien viste at fisk som ble satt på våren kunne gå en lengre periode (måned) før de ble smittet, mens fisk satt ut på sensommer og høst ble smittet nesten umiddelbart etter utsett. Både fisk som ble satt ut i sjøen om våren og om høsten ble infisert med bendelorm. Infeksjon ser ut til å skje i mai til februar med høyest smittepress på høsten (august - desember). Infeksjon korresponderer sannsynligvis med tilgjengelighet av infiserte mellomverter (kopepoder). Grad av infeksjon var også avhengig av fiskestørrelse. Det ble nesten ikke funnet nyetablerte larver (plerocercoider) i tarmtrakten på fisk over 30 cm, og det ble funnet svært få i kategorien juvenil 1 (<1 cm) i fisk større enn 40 cm. Dette skyldes sannsynligvis at gjellegitterstavene til fisken har blitt for store til å fange opp kopepoder og/eller at de større fiskene i mindre grad aktivt beiter på kopepoder.

Påvirkning

En evaluering av bendelormens innflytelse på tilvekst og fôrforbruk ble gjort på resultatene fra spørreundersøkelsen og *Havbruksdata*. Det ble funnet at fiskegrupper med få infiserte individer ikke skilte seg signifikant fra uinfiserte grupper når det gjaldt tilvekst. Fiskegrupper med middels eller stor andel infiserte fisk hadde signifikant dårligere tilvekst. Uinfiserte fiskegrupper og grupper med få infiserte fisk hadde lavere fôrforbruk enn fiskegrupper med middels eller stor andel infiserte fisk. Det ser ut til at fisken kan kompensere for de negative effektene av en infeksjon med bendelorm ved å øke fôrintaket.

Resistens

Det ble ikke utført resistenstesting mot praziquantel med bioassay i prosjektet på grunn av koronapandemien. Spørreundersøkelsen gav også for lite data til å konkludere noe om resistens.

Behandlingsregime i forhold til infeksjonsdynamikk og livssyklus

Da medisineringsforsøket som var planlagt i denne delen av prosjektet ikke kunne gjennomføres, ble i stedet kunnskap fra de andre delene prosjektet, først og fremst fra kohortstudien, og fra andre studier, sammenstilt til i en beste praksis for behandling. Resultatene fra kohortstudien viser at både fisk utsatt om høsten og om våren blir infisert, men at fisk utsatt på høsten blir infisert raskere og med flere parasitter (høyere abundans). Infeksjonspresset er høyest sensommer og høst og det er lavt vinter-vår. Den største risikofaktoren mhp infeksjon er størrelsen på fisken. Liten fisk blir infisert raskere og med høyere abundans enn større fisk. Fisk større enn 30 cm blir i liten grad infisert, heller ikke re-infisert etter behandling (egne observasjoner). Smittebærende kopepoder forekommer særlig i overflatevannet. Skjerming (skjørt eller snorkel) den første tiden i sjøen vil derfor redusere infeksjonene. Størrelsen på fisken har betydning for valg av tidspunkt for behandling. Det synes best å behandle når fisken er over 30 cm, for da vil en i stor grad unngå reinfeksjon. Det vil gi best lønnsomhet å gjennomføre behandling så fort som mulig etter at en når denne størrelsen, og liten fisk trenger også mindre medisin enn stor fisk for å oppnå anbefalt dose (mg medisin/ kg fisk). Det vil også gi lengre vekstperiode med god utnytting av fôret etter behandling, noe som gir best lønnsomhet.

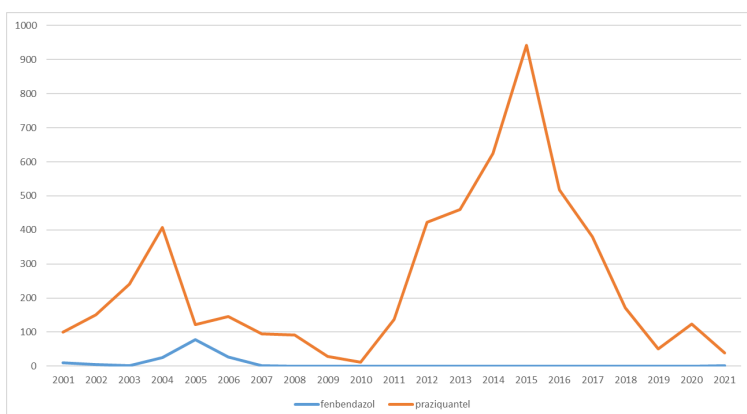
3 Hovedfunn

- Genomet til *Eubothrium crassum* fra laks og ørret har blitt sekvensert og annotert for første gang.
- *Eubothrium* er én og samme art i både ferskvann og saltvann, nemlig *Eubothrium crassum*. Arten kan deles inn i to genetiske undergrupper, én knyttet til ferskvann og én marin form.
- Gener som koder for proteinene som danner ione-kanalene som er vist å være mål for praziquantel er identifisert genomet til *E. crassum*. Denne kunnskapen kan brukes i videre studier og blant annet til utvikle genetiske markører for å studere resistens.
- En ikke-letal metode for å påvise bendelorminfeksjoner fra svaberprøver tatt fra gattet til fisk er utviklet.
- *Eubothrium crassum* er utbredt i norsk sjøoppdrett nord til 65 grader nordlig bredde og synes totalt fraværende fra og med produksjonsområde 8 (PO8).
- Laks som settes ut på våren kan gå en lengre periode (måneder) før de blir smittet av bendelorm, mens fisk satt ut på sensommer og høst blir smittet nesten umiddelbart etter utsett. Dette har sammenheng med tilgjengeligheten av mellomverter (kopepoder).
- Infeksjon skjer hovedsakelig når fisken er under 30 cm.
Fisk med middels eller mye bendelorm har signifikant dårligere tilvekst og uinfisert fisk eller fisk med få bendelorm har lavere fôrforbruk enn fisk med middels eller mye bendelorm.

4 Innledning

Bendelormen¹ *Eubothrium crassum* infiserer laks og ørret i ferskvann. I sjøoppdrett av laksefisk er en lik, men gjerne større variant vanlig, ofte referert til som *Eubothrium* sp. Denne gjennomfører livssyklusen i marint miljø, men det har vært uavklart om dette er to arter (Bristow and Berland, 1989; Bristow and Berland, 1991) eller én art som kan gjennomføre livssyklusen i begge miljø (Scholz et al., 2003). For oppdretteren kan infeksjoner med *Eubothrium* sp. ha negative effekter ved å redusere tilveksten til laksen (Berland and Bristow, 1990; Bristow and Berland, 1991; Saksvik et al., 2001a). En har derfor behandlet med anthelmintica i fôret som dreper parasitten. Både praziquantel (Droncit vet., Bayer) og fenbendazol (Panacur, MSD) har vært brukt til behandling av laksefisk.

De siste årene før oppstarten av dette prosjektet i 2017 var det et økende antall rapporter om og bekymringer for mulig utvikling av resistens mot Praziquantel (PZQ) hos bendelormen *Eubothrium* sp. i norsk havbruk (Hjeltnes et al., 2016). Dette manifesterte seg ved at oppdrettere i økende grad så at behandling med PZQ ikke ga forventet resultat, og tilsvarende at salget av PZQ økte kraftig fra 2010 til 2015 (Figur 1). Etter 2015 sank salget av PZQ markant uten at problemene med bendelorm har avtatt, og salget har vært lavt de siste årene. Selv om infeksjoner med *Eubothrium* sp. ser ut til å bli stadig mer vanlig forekommende i enkelte produksjonsområder (PO), spesielt PO2 og PO3, er det utført lite forskning på *Eubothrium* sp. i laks de siste årene. Det var derfor behov for økt forskningsfokus på flere aspekter knyttet til denne parasitten hos oppdrettsfisk, blant annet; infeksjonsdynamikk (oppdrettslaks); betydning av fiskestørrelse, utbredelsen til parasitten i norske oppdrettsanlegg, effekt på verten og utvikling av resistens i ulike geografiske områder, populasjonsgenetikk (tilstedeværelsen av stammer og varianter i ulike områder) og genomikk/transkriptomikk; diagnostiske, taksonomiske spørsmål knyttet til en ferskvanns- versus marin "form" av *Eubothrium*.



Figur 1. Forbruk av legemidler mot bendelorm i akvakultur i Norge (Data fra Folkehelseinstituttet <https://www.fhi.no/hn/legemiddelbruk/fisk/2021-bruk-av-legemidler-i-fiskeoppdrett/>)

¹ I opprinnelig prosjektittel brukte vi ordet bendelmark, men dette er i nå byttet ut med bendelorm. Årsaken til dette er at bendelorm er en mer korrekt betegnelse på norsk, og at «orm» egentlig er et begrep knyttet til visse evertebrater inklusivt innvollssorm (rundorm, flatorm, krassere).

Dette prosjektet ble derfor igangsatt for å øke kunnskapen om infeksjoner med *Eubothrium* sp. i norske oppdrettsanlegg og å svare på noen av disse spørsmålene. Prosjektet var også ment å legge et kunnskapsgrunnlag for videre forskning.

Prosjektet har på grunn av Covid-19 og andre forhold forandret innhold flere ganger og det har også blitt utsatt. Rapporten beskriver derfor ikke alle opprinnelige planer for prosjektet og avvik fra disse da dette ville blitt svært uoversiktlig. Fullstendig beskrivelse av prosjektets opprinnelige plan finnes på nettsidene til FHF (<https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/901449/>) og avvikene er oppsummert kort i et eget kapittel til slutt i rapporten. Der det faller naturlig er noen avvik likevel nevnt også inne i teksten i rapporten. Alle avvik er avklart med FHF underveis i prosjektet.

5 Problemstilling og formål

Hovedmålet til prosjektet var å øke kunnskapen om bendelorminfeksjoner i norske oppdrettsanlegg og å lage et kunnskapsgrunnlag for videre forskning for å gi bedre bekjempelse av infeksjoner med denne parasitten. Prosjektet ble inndelt i fire hoveddeler:

1: Den geografiske utbredelse til *Eubothrium* sp. og til populasjoner av parasitten som er resistente mot praziquantel.

Det er kjent at bendelorm i slekten *Eubothrium* er vanlig forekommende i norske oppdrettsanlegg i deler av landet, men utbredelsen har aldri vært studert i detalj. Målet for denne delen av prosjektet var derfor å få mer detaljert kunnskap om utbredelsen til *Eubothrium* sp. i sjøoppdrett og om utbredelsen av resistens mot praziquantel.

2: Diagnostikk, populasjonsgenetikk og genomikk

Det er per i dag lite kunnskap om genetikken til *Eubothrium* spp. og taksonomien innen slekten er ikke avklart. Med uklar taksonomi og lite kunnskap om den genetiske variasjonen innen artene vil også den molekylære diagnostikken være tilsvarende uklar. Målet for denne delen av prosjektet var derfor å studere om bendelorm i slekten *Eubothrium* fra ferskvann og saltvann er én og samme art og hvilken grad av genetisk variasjon det finnes mellom forskjellige populasjoner. Dersom det er samme art så betyr det at fisk kan infiseres i både ferskvann og sjøvann. I tillegg var det mål å utvikle en ikke-invasiv metode for å påvise *Eubothrium* spp. i faecesprøver fra fisk slik, at denne metoden kan erstatte eller være supplementær til obduksjon som metode.

3: Påvirkningen av infeksjoner med *Eubothrium* sp. på veksten og helsen til fiskeverten

Oppdrettet atlantisk laks kan ha så intense bendelorminfeksjoner at blindsekkene og tarmen virker blokkert. Dette kan gi redusert plass til mat, og bendelormene vil ta opp mye næring og kan påvirke fordøyelsen. Målet for denne delen av prosjektet var derfor å studere hva slags påvirkning bendelorminfeksjoner har på veksten og fôrutnyttelsen til fiskeverten.

4: Behandlingsprosedyrer

Behandlinger mot bendelorm gjennomføres i dag ved medisinerings med Praziquantel² via fôret, men det er manglende kunnskap om hvilke(t) behandlingsregime(r) som er de best egnede, inkludert kunnskap om medisindoser, størrelse på fisken ved behandling og hvordan behandlinger skal evalueres. Målet med denne delen av prosjektet var derfor få økt kunnskap om det mest optimale behandlingsregimet mot bendelorminfeksjoner i oppdrettsfisk.

² Det har også tidligere i begrenset grad vært behandlet med Fenbendazol (se figur 1).

6 Prosjektorganisering

Prosjektgruppen

Haakon Hansen, Veterinærinstituttet
Sigmund Sevatdal, VESO
Kristin Eikemo, Lerøy Vest
Anna Lena Kleppa, MOWI AS
Randi V. Thon, MOWI AS
Marianne Elnæs, MOWIAS
Margunn Sandstad, Skretting AS
Egil Karlsbakk, Universitetet i Bergen

Styringsgruppen

Aud Aasheim AkvaVet Gulen AS
Barbo Klakegg, Åkerblå AS
Henrik Trengereid, MOWI AS

FHF-observatør

Sven Martin Jørgensen

7 Gjennomføring, resultater, diskusjon og konklusjon fra de forskjellige deler av prosjektet.

7.1 Del 1: Den geografiske utbredelse til *Eubothrium* sp. og til populasjoner av parasitten som er resistente mot praziquantel.

Ansvarlig for aktivitet: Haakon Hansen

Bidragstere: Sigmund Sevatdal, Lars Qviller, Egil Karlsbakk

7.1.1 Introduksjon

Det var kjent ved prosjektets start at infeksjoner med bendelorm syntes å være veldig vanlige forekommende i oppdrettsfisk noen områder, slik som Rogaland og Hordaland, mens de var sjeldne i andre områder, da spesielt i nordlige områder i Norge. I tillegg rapporterte oppdrettere i økende grad om behandlinger som ikke gav ønsket resultat. Dette, sammen med at salget av praziquantel i perioder hadde vist en økning, ga grunn til å frykte at parasitten kunne ha utviklet resistens mot dette legemidlet. Sporadiske tester med bioassay bekreftet også at bendelorm på enkelte lokaliteter var resistente mot praziquantel. Før dette prosjektet startet var det imidlertid ikke gjennomført systematiske undersøkelser med hensyn på hverken utbredelsen til parasitten generelt eller på utbredelsen til resistente populasjoner av parasitten.

7.1.2 Problemstilling

Målet for denne delen av prosjektet var å få mer detaljert kunnskap om utbredelsen til *Eubothrium* sp. i laksefisk oppdrettet i sjø i Norge. I tillegg ønsket vi å se på utbredelsen til av resistens hos parasitter mot praziquantel.

7.1.3 Materiale og metode, del 1

For å forsøke å kartlegge utbredelse og mengde av *Eubothrium* sp. i oppdrettet laksefisk i Norge, ble det gjennomført en spørreundersøkelse hos fiskehelsetjenester og oppdrettsfirmaer. Det ble da også stilt spørsmål om bendelorm er resistente mot Praziquantel og hvor utbredt denne resistensen eventuelt er. I tillegg til spørreundersøkelsen ble en rekke lokaliteter undersøkt gjennom produksjonssyklusen i en kohortstudie der endringer i prevalens³ og abundans⁴ ble kartlagt (beskrevet under kapittel 7.3.3.1). Dette skulle gi innsikt i sesongvariasjonen av parasitten i lakseoppdrettsanlegg.

7.1.3.1 Beskrivelse av spørreundersøkelsen

Spørreundersøkelsen ble sendt ut til Åkerblå AS⁵, MOWI, STIM AS, HaVet AS, AquaKompetanse AS, Lerøy Sjøtroll, Akvavet Gulen, Marin Helse, Labora AS og FoMAS. Det ble mottatt svar fra Åkerblå, MOWI, STIM AS, HaVet AS, AquaKompetanse AS, Lerøy Sjøtroll og Akvavet Gulen. I tillegg rapporterte fiskehelsetjenester fra PO8 pg nordover at de aldri hadde registrert

³ Prevalens er definert som andelen infiserte individer i en populasjon. Oppgis ofte i prosent.

⁴ Abundans, eller gjennomsnittlig abundans, er definert som gjennomsnittet av antall parasitter på antall verter som er infisert.

⁵ FoMAS og Marin Helse AS ble fra 1. januar 2022 fusjonert inn i Åkerblå AS.

bendelorm og at de derfor ikke anså det nødvendig å fylle ut spørreskjemaet. Spørreundersøkelsen ble satt til å gjelde fisk satt ut fra tidligst fra høst 2013 til og med høst 2019 og spørsmålene som skulle besvares var:

- **Undersøkelsestidspunkt:** år
- **Lokalitetsnavn:** Fra akvakulturregisteret
- **Lokalitetsnummer:** Fra akvakulturregisteret
- **Utsettstidspunkt:** Årstid og år
- **Påvisning:** Har det vært påvist infeksjoner med bendelorm (*Eubothrium* sp.) i det aktuelle år? Anslå ca hvor stor andel av fisken som var infisert eller om det ikke var undersøkt i det året: «Ikke undersøkt», 0 (ikke påvist), 1 (lite)=hvis det påvises en og annen bendelorm, 2 (middels)=10- 50%, vanlig forekommende, men ikke alle fisk er infisert, 3 (mye)= 50 - 100%, vanlig forekommende og ofte alle eller nesten alle fisk er infisert. Svaralternativet "ikke undersøkt" kan også brukes hvis dere ikke hadde fiskehelseansvar for det anlegget det aktuelle året.
- **Behandling:** Har det blitt behandlet med Praziquantel mot bendelorm på anlegget?
- **Effekt av behandling:** Dersom det ble svart ja på forrige spørsmål skulle effekt evaluéres med følgende svarmuligheter: "ikke aktuelt" hvis det ikke er behandlet, "God effekt"= mer enn 50% reduksjon i prevalens etter behandling, "lav eller ingen effekt"= effekten er evaluert og funnet å være lavere enn 50%, "Usikker effekt/vet ikke"=hvis usikker eller ikke evaluert.
- **Resistenstesting:** Angi resultat av test med følgende svarmuligheter: ikke testet, påvist resistens, ikke påvist resistens.
- **Skjørt:** Har anlegget brukt skjørt mot lakselus i de første 6 mnd. Svaralternativer: Ja, nei, vet ikke. Hvis skjørt var brukt kortere enn 6 måneder skulle dette angis under kommentarer.
- **Andre kommentarer:** Eventuelle andre kommentarer som var ansett som relevante: Store problemer med andre sykdommer/agens, dårlig vekst på fisken, etc.

Angi årstallet. Alternativt i rullegardinmeny	Lokalitetsnavn: Angi lokalitetsnavn fra akvakulturregisteret	Lokalitetsnummer: Angi lokalitetsnummer fra akvakulturregisteret	Utsettstidspunkt: Angi når fisken i anlegget ble satt ut. Alternativt i rullegardinmeny	Påvisning: Har det vært påvist infeksjoner med bendelorm (<i>Eubothrium</i> sp.) i det aktuelle år? Anslå ca hvor stor andel av fisken som var infisert eller om det ikke var undersøkt i det året. Svaralternativer i rullegardinmeny: «Ikke undersøkt», 0 (ikke påvist), 1 (lite)=hvis det påvises en og annen bendelorm, 2 (middels)=10- 50%, vanlig forekommende, men ikke alle fisk er infisert, 3 (mye)= 50- 100%, vanlig forekommende og ofte alle eller nesten alle fisk er infisert. Svaralternativet "ikke undersøkt" kan også brukes hvis dere ikke hadde fiskehelseansvar for det anlegget det aktuelle året.	Behandling: Har det blitt behandlet med Praziquantel mot bendelorm på anlegget? Alternativt i rullegardinmeny	Effekt av behandling: Dersom det er svart ja i forrige kolonne, evaluér effekt. Alternativt i rullegardinmeny. Hak av for "ikke aktuelt" hvis det ikke er behandlet. "God effekt"= mer enn 50% reduksjon i prevalens etter behandling "lav eller ingen effekt"= effekten er evaluert og funnet å være lavere enn 50% "Usikker effekt/vet ikke"=hvis usikker eller ikke evaluert.	Resistenstesting: Angi resultat av test. Alternativt i rullegardinmeny	Skjørt: har anlegget brukt skjørt mot lakselus i de første 6 mnd. Hvis kortere enn 6 mnd angis dette i neste kolonne. Alternativt i rullegardinmeny.	Andre kommentarer: Eventuelle andre kommentarer som dere anser som relevante: store problemer med andre sykdommer/agens, dårlig vekst på fisken, etc.
År	Lokalitetsnavn	Lokalitetsnummer	Utsettstidspunkt	Påvisning	Behandling	Effekt av behandling	Resistenstesting	Skjørt	Andre kommentarer
2013	A	1	H2013	1 (lite)	NEI	IKKE AKTUELT	IKKE TESTET	JA	
2019	B	1	H2019	2 (middels)	JA	GOD EFFEKT	IKKE PÅVIST RESISTENS	JA	

Figur 2. Skjermbilde fra spørreundersøkelsen (Excel) som ble sendt ut til fiskehelsetjenester og oppdrettsfirmaer.

Databehandling

I analysene ble sammenhenger mellom påvisning av bendelorm og de følgende potensielle forklaringsvariablene undersøkt: Antall laksefisk på lokaliteten, oppdrettstetthet, utsettstidspunkt, breddegrad, år for undersøkelse, vekt ved utsett, og om fisken var flyttet mellom lokaliteter.

Dataene fra spørreundersøkelsen inneholdt ikke informasjon om blant annet oppdrettstetthet, antall fisk på lokalitetene og breddegrad. For å analysere med hensyn til mønstre i geografi og oppdrettsspesifikke parametere som ikke inngikk i spørreundersøkelsen, ble data fra spørreundersøkelsen koblet sammen med data fra *Havbruksdata* og Lokalitetsregisteret. *Havbruksdata* er et datasett som samles inn av Fiskeridirektoratet, basert på oppdretternes egne månedlige registreringer av oppdrettsspesifikke data. Lokalitetsregisteret er Fiskeridirektoratets oversikt over alle godkjente lokaliteter for akvakultur og akvakulturtillatelser. Fra *Havbruksdata* ble antall laksefisk på lokalitetene inkludert i tillegg til følgende egne omregnede variabler basert på data fra *Havbruksdata*: vekt på fisken ved utsett (laveste vekt registrert i hver kohort, unik generasjon på hver lokalitet) og oppdrettstetthet i området beregnet etter metode i Jansen et al. (2012). Lokalitetsregisteret ble brukt for å hente ut geografiske koordinater for plotting i kart og for data for breddegrader for de statistiske analysene.

Fra spørreundersøkelsene ble det inkludert informasjon om hvorvidt bendelorm ble påvist, om utsettstidspunkt (høst/vår) og år for prøvetaking. En lokalitet ble regnet som positiv hvis minimum én av observasjonene fra lokaliteten var positiv for bendelorm. *Havbruksdata* inneholdt også informasjon om utsettstidspunkt og dette gir en ekstra kontroll på om data er riktige. I tilfeller der det ikke var overensstemmelse mellom utsettstidspunkt mellom *Havbruksdata* og innrapportert fra spørreundersøkelsen, ble datapunktet utelatt fra analysen fordi vi ikke kunne koble sammen data, og informasjonene i en av kildene måtte da være feil.

Det er ikke kjent om laks kan kvitte seg med infeksjoner med bendelorm, men det er mest sannsynlig at når en infeksjon først er etablert så vil parasitten bli værende i laksen i lang tid. Prøvetakingstidspunkt gir derfor lite informasjon om på hvilket tidspunkt fisken ble infisert. I analysene ble det derfor beregnet gjennomsnittsverdier for alle kontinuerlige variabler som varierer over tid gjennom kohorten.

Statistikk

Innledende analyser indikerte at oppdrettsspesifikke variabler som varierte gjennom produksjonsperioden ga best tilpasning til modellen ved å beregne gjennomsnitt for de første 9 månedene i sjø. Observasjoner med vekt ved utsett over 500 g ble fjernet fra videre analyser, fordi en så høy startvekt indikerer at fisken kan ha blitt flyttet. Flytting av fisk medfører usikkerhet ved andre produksjonsvariabler.

For å lete etter mønstre og sammenhenger mellom forklaringsvariablene ble generaliserte lineære modeller (GLM) brukt. Dette er regresjonsliknende analyser som kan ta hensyn til andre sannsynlighetsfordelinger enn normalfordelingen. I analysene var responsvariabelen en to-nivå variabel, som indikerte om bendelorm ble påvist eller ikke. Dette er en såkalt binomial, eller Bernoulli-respons, som best kan analyseres med GLM-modeller som forventer en binomial sannsynlighetsfordeling (logistisk regresjon). I tillegg inneholdt datasettet observasjoner fra flere generasjoner fra samme lokalitet, og det er da forventet at det er mindre variasjon mellom repeterte undersøkelser på samme lokalitet, enn mellom lokaliteter. Dette bryter med antagelsen om at alle data er uavhengige. For å håndtere dette ble lokalitetsnummer inkludert som såkalt *random effekt* i modellene.

For å finne ut hvilke av de potensielle forklaringsvariablene som ga signifikant forklaringskraft på infeksjonsstatus ble en modellseleksjon gjennomført. Det innebærer at modeller der infeksjonsstatus modelleres som en respons av forskjellige kombinasjoner av

forklaringsvariabler tilpasses, og den modellen som gir optimal tilpasning mellom data og modell, velges som den beste. I denne analysen ble det gjort en uttømmende modellseleksjon, der alle kombinasjoner av forklaringsvariablene ble inkludert.

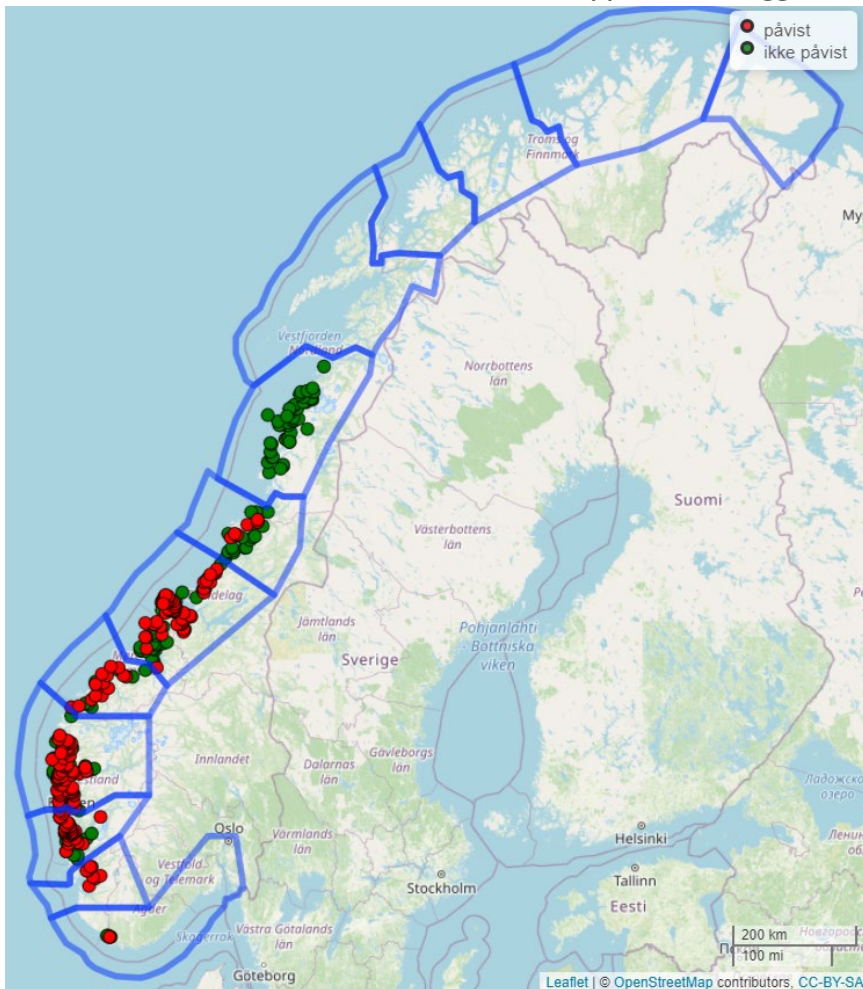
I tillegg til analysen som beskrives over, ble den samme øvelsen utført på et redusert datasett som bare inkluderte registreringer med behandling, der behandlingseffekt ble brukt som respons. Behandlingseffekten ble beskrevet som enten full behandlingseffekt, eller redusert behandlingseffekt, i en binomial variabel.

7.1.4 Resultater og diskusjon

7.1.4.1 Oppsummerende data fra spørreundersøkelsen

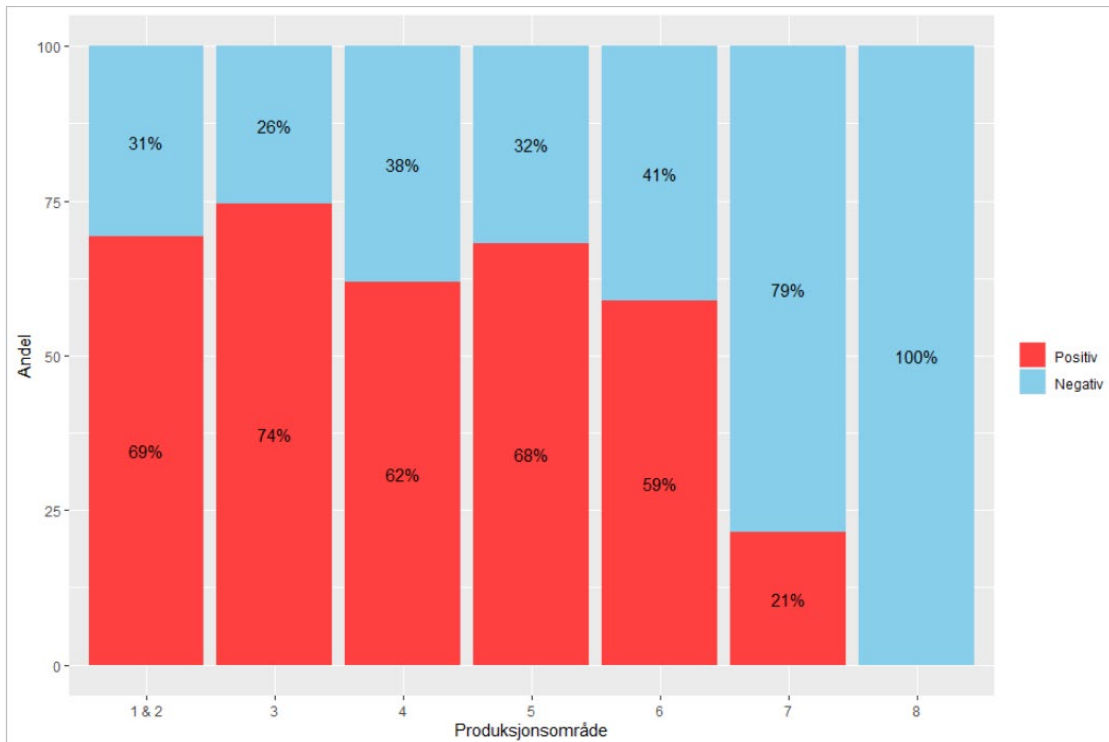
Det totale datasettet fra spørreundersøkelsen bestod opprinnelig av 1093 observasjoner. Av disse hadde 127 utilstrekkelig informasjon, slik at de ikke kunne kobles til *Havbruksdata* med lokalitetsnummer. I de fleste tilfellene skyldtes dette at lokalitetsnummer ikke fantes, eller fordi riktig generasjon ikke kunne kobles via dato for utsett i *Havbruksdata*. Seks observasjoner manglet informasjon om bendelormpåvisning, tre observasjoner var merket som ikke undersøkt og to hadde uklar oppføring av år for undersøkelse. I tillegg hadde 44 kohorter registrert startvekt over 500 gram i *Havbruksdata*. Det endelige datasettet var derfor på 911 komplette observasjoner med ekstra informasjon fra *Havbruksdata*. De 911 komplette svarene kom fra 589 unike kohorter fordelt på 333 unike lokaliteter. I spørreundersøkelsen ble det satt en grense ved fisk utsatt høsten 2013 når det gjaldt hvor langt tilbake i tid observasjonene skulle gå. Det varierte imidlertid mellom respondentene hvor langt tilbake i tid de hadde registreringer. Fiskehelsetjenester og oppdrettere i Nord-Norge har aldri rapportert om infeksjoner med bendelorm og de fikk derfor ikke tilsendt spørreskjema. Svarene fordelte seg derfor på PO1 til PO8.

7.1.4.2 Utbredelse av bendelorm i norske oppdrettsanlegg



Figur 3. Kart som viser utbredelsen til *Eubothrium* sp. i 333 norske oppdrettsanlegg. Datapunktene er basert på resultater fra en spørreundersøkelse. Røde sirkler=påvist minimum én gang på lokaliteten, Grønne sirkler= ikke påvist. Blå linjer omkranser de 13 forskjellige produksjonsområdene i norsk oppdrettsnæring med PO1 lengst sør og PO13 lengst i nord.

Figur 3 viser utbredelsen av *Eubothrium* i norske oppdrettsanlegg slik den fremkommer gjennom spørreundersøkelsen. Bendelorm er utbredt i oppdrettsanlegg fra produksjonsområde 1, PO1, sør i landet til PO7 i de nordlige deler av Trøndelag (se Figur 3). Våre resultater viser at det går et klart skille for utbredelsen mellom PO7 og PO8 (Figur 3 og Figur 4). Sannsynligheten for at fisken i et anlegg er infisert går ned med økende breddegrad i vårt datasett (se Tabell 1 og Figur 5 C) og det er en tydelig økning av antall anlegg uten parasitten når vi når PO7 (Figur 4). I PO8 er det ikke påvisninger i det hele tatt. Grensen for nordlig utbredelse i norsk oppdrettslaks antas derfor å ligge i produksjonsområde 7, med nordligste sikre påvisning ved ca 65 grader nord (desimalgrader, WGS84 datum). Vi har ikke data fra PO9 og nordover, men fiskehelsetjenestene melder om at det ikke er påvist infeksjoner i noen av disse områdene. Gjennom diagnostiske prøver mottatt hos Veterinærinstituttet er det imidlertid ved ett tilfelle påvist *Eubothrium* sp. så langt nord som i Lofoten, men parasitten har ikke vært påvist ved samme anlegg siden. Opphavet til denne enkeltstående påvisningen er ikke klarlagt og det er derfor usikkert om den f.eks. kan ha kommet til anlegget med settefisk som var infisert fra ferskvannsfasen. I *Eubothrium crassum* forekommer i ferskvann både i Nordland, Troms og Finnmark (Vik, 1963).



Figur 4. Søylediagram som viser andelen av positive og negative oppdrettsanlegg gruppert etter produksjonsområde (PO). Resultatene stammer fra en spørreundersøkelse. PO1 og 2 er slått sammen da det var få observasjoner for disse to områdene. Et oppdrettsanlegg ble regnet som positivt hvis *Eubothrium* sp. hadde vært påvist minst en gang ved anlegget.

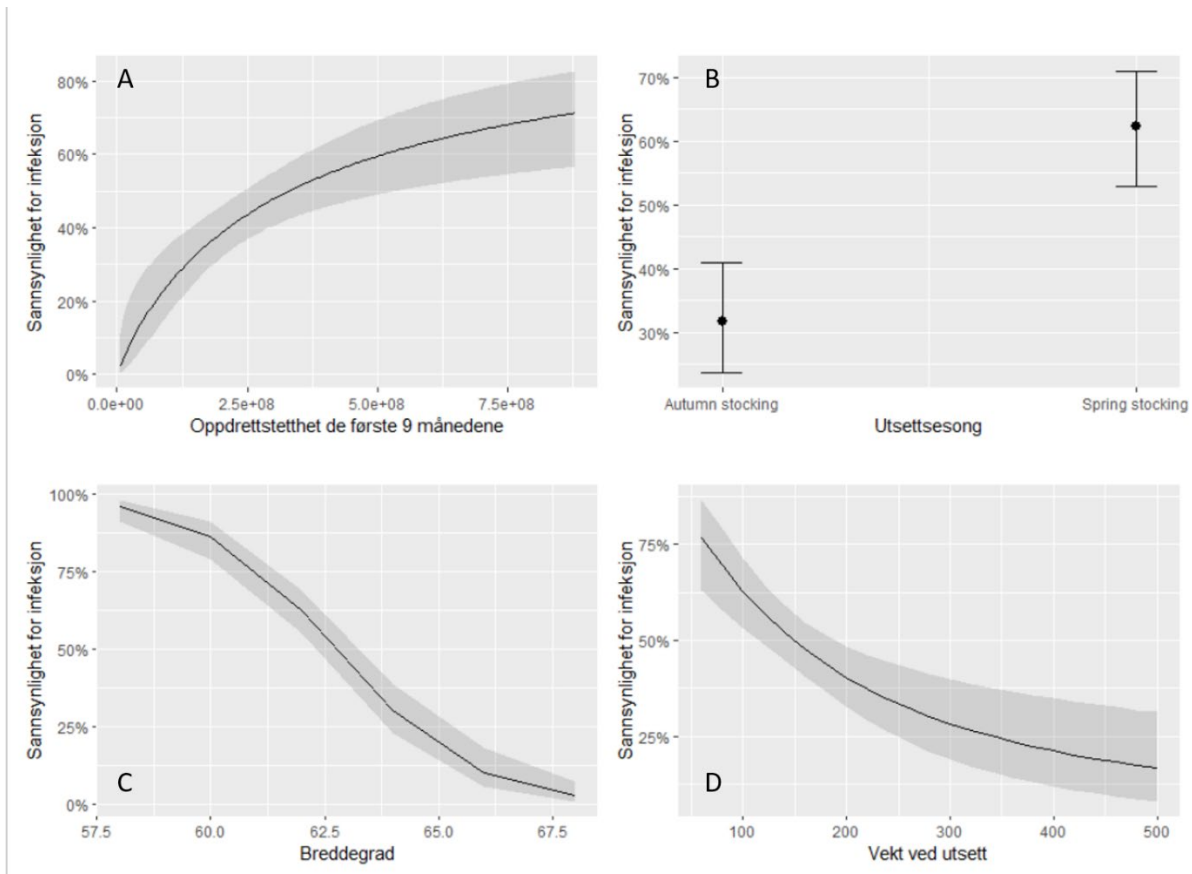
Den modellen som best forklarte infeksjonsstatus var basert på 911 observasjoner etter at observasjoner med manglende informasjon eller vekt over 500 g ved utsett ble ekskludert. Modellen inkluderte følgende variabler:

- oppdrettstetthet, med økende sannsynlighet for infeksjon ved økende oppdrettstetthet
- breddegrad, med synkende sannsynlighet for infeksjon ved økende breddegrad
- synkende sannsynlighet for infeksjon ved økende vekt ved utsett.
- utsettstidspunkt, med høyest sannsynlighet for infeksjon ved vårutsett

Tabell 1. Modelltabell som viser effekter av forklaringsvariabler (uten random effekt) fra den beste modellen. Merk at oppdrettstetthet og vekt ved utsett er logtransformert for komme nærmere normalfordeling i forklaringsvariablene, mens breddegrad ble skalert for å kunne identifisere effekter bedre i modelltilpasningen.

Conditional model:			
	Estimate	Std. Error	Pr(> z)
Oppdrettstetthet*	0,9	0,23	< 0,001
Høstutsett	-12	4,7	0,011
Vårutsett	-11	4,7	0,023
scale(breddegrad)	-1,3	0,33	< 0,001
vekt ved utsett**	-1,3	0,18	< 0,001

**log₁₀x transformert, **log₁₀x+1 transformert



Figur 5. Plot som viser effekt av de fire forklaringsvariablene i modellen, henholdsvis oppdrettstetthet, utsettsesong, breddegrad og vekt ved utsett. Merk at vekt ved utsett har noen til dels veldig høye verdier. Dette skyldes sannsynligvis at noen av kohortene har blitt flyttet, slik at første registrering av vekt på lokaliteten har kommet langt ut i produksjonsyklus.

Det helt tydelige fraværet av infeksjoner som vi ser fra PO8 og nordover (se Figur 3 og Figur 4), kan ha en biologisk forklaring ved at mellomverteene ikke er tilstede eller er fåtallige, noe som kan skyldes at klimaet ikke er gunstig for disse. Da alle potensielle mellomverter ikke er kjent og kan spille en viktig rolle i infeksjonsdynamikken, er dette vanskelig å evaluere. Noe er imidlertid kjent om mellomverter og deres biologi. Sannsynlige mellomverter for *Eubothrium* sp. i sjøvann er *Acartia clausi* og *Temora longicornis* (Hodneland and Solberg, 1995). *Calanus finmarchicus*, som er en vanlig kopepode langs hele kysten, er ikke aktuell (Hodneland and Solberg, 1995). Generelt vil mengden kopepoder langs kysten, som *Acartia clausi*, følger temperatur, lys og tilgjengelighet på føde. De overvintrer som hvilestadier (egg) (Uye, 1985) eller som gravide hunner (Norrbin et al., 1990). Populasjonsstørrelsen til *Acartia* spp. kan nå en topp i juli og september og denne arten ser ut til å være mest vanlig i de øvre vannmassene. Forekomsten av *Temora longicornis* er mer sporadisk, med høyeste antall om sommeren (Gundersen, 1953; Matthews, 1967). Migrerende laksesmolt spiser på en rekke organismer i kystnære farvann, inkludert marine kopepoder (Rikardsen et al., 2007; Rikardsen et al., 2004). Rikardsen et al. (Rikardsen et al., 2004) undersøkte de geografiske forskjellene i føring hos laksesmolt og fant at forekomst av kopepoder varierte, men kunne være mer enn 50% av føden. Imidlertid så det ut til at kopepoder var viktigere i den sørlige delen av Norge enn i Nord-Norge. Kopepoder ble ikke funnet i mageinnhold hos villaks nord for Namsenfjorden i Midt-Norge. Dette utelukker ikke marin infeksjon av *Eubothrium* sp i nord, men infeksjonsvinduet kan være mindre. Det betyr at periodene der det er rikelig med kopepoder

samtidig som det er migrerende smolt, er kort og ikke alltid overlapper. *Eubothrium* spp. er utbredt i ville laksefisk i ferskvann i Nord-Norge (Kennedy, 1978b; Sterud, 1999; Vik, 1963), og bendelormen overlever flere måneder i smolt etter sjøsetting (Karlsbakk & Hodneland upublisert). Det er derfor bemerkelsesverdig at en ikke ser infeksjoner i sjøoppdrettet laks i samme område, når parasitten forekommer i sjøørret i sjø. Analyser av genomiske data (se kapittel 7.2) viste at *Eubothrium* sp. som infiserer stor villaks og oppdrettslaks (og regnbueørret) i sjø og *E. crassum* i ørret (både sjøørret og fra innsjøer) og fra laks i Østersjøen, tilhører to adskilte genetiske grupperinger. Det er mulig at disse variantene, som vi foreløpig kan referere til som marine og limnisk former av *Eubothrium crassum*, er så tilpasset forskjellige copepodverter i disse miljøene at livssyklusen ikke vil fullføres i et annet miljø.

Det at sannsynligheten for infeksjon tilsynelatende øker med økende oppdrettstetthet kan ha sammenheng med at nord-sør-gradienten i forekomst også korrelerer med oppdrettstetthet. Analysene kan ikke skille bidraget til hver enkelt variabel på sannsynligheten for at fisken i et anlegg blir smittet. Det synes likevel sannsynlig at det i områder med stor oppdrettstetthet vil bli et økende smittepress over tid øke som følge av en stor mengde infiserte verter. Hver enkelt voksen bendelorm produserer kontinuerlig et stort antall egg og disse vil føre til at mellomvertene har større sannsynlighet for å bli infisert, noe som igjen gir økt smittepress for fisken i området.

At sannsynligheten for infeksjon minket med økende breddegrad fra PO1&2 til PO8 kan skyldes flere årsaker som diskutert over. Temperatur kan påvirke livssyklusen, egnede mellomverter kan være lite utbredt eller fraværende i sjøen. Lavere oppdrettstetthet vil også kunne gi lavere smittepress lengre nord, men dette kan neppe forklare et tilsynelatende fullstendig fravær i oppdrettslaks i sjø. Det er også forskjeller mellom produksjonsområder når det gjelder bruken av skjørt mot lus, og dette kan også virke mot bendelorm og påvirke og skape støy i resultatene. Geitung et al. (2021) viste at skjerming (snorkelmerder) reduserte infeksjon også av *Eubothrium* sp, og konkluderte med at snorkelmerd eller annen teknologi som skjerner mot lakselus, også ville ha effekt mot bendelorm ved å holde de smittebærende kopepodene ute av anlegget Dataene fra spørreundersøkelsen med hensyn på bruk av skjørt var mangelfulle og kunne ikke brukes til å belyse dette.

Når det gjelder den minkende sannsynligheten for smitte ved økende vekt ved utsett, så har dette sannsynligvis sammenheng med at fisk over en viss størrelse i mindre grad får i seg kopepoder da avstanden mellom gjellegitterstavene blir så store at kopepodene ikke filtreres ut. Dette ble også funnet i kohortstudien og diskuteres nærmere der (se 7.3).

I analysen påvises det en sammenheng mellom tidspunkt for utsetting i sjø og infeksjon i løpet av produksjonsperioden. Analysen viste at risikoen er størst for utsett om våren. Dette har ikke noen innlysende forklaring, spesielt ikke ut fra resultatene i kohortstudien (se kapittel 7.3) hvor resultatene viste at fisk satt ut på høsten blir infisert så å si umiddelbart etter utsett. Det er imidlertid ikke nødvendigvis noen sammenheng eller motsetning i disse funnene, da analysene fra spørreundersøkelsen baserer seg på gjennomsnittstall og fra et større geografisk område enn kohortstudien. Det kan også være støy i dataene i form av f.eks. forskjeller i utsettstidspunkt mellom forskjellige områder. For å se litt nærmere på dette har vi i Tabell 2 sett på fordelingen av vår- og høstutsett i de forskjellige produksjonsområdene. Vi ser av tabellene at det var noe ulik fordeling av utsettstidspunkt innad i hver PO noe som kan innvirke på resultatene. Vi kan ikke derfor ikke komme med en god forklaring på hvorfor det

tilsynelatende er større sannsynlighet for infeksjon ved vårutsett, eller om dette er et reelt resultat i det hele tatt.

Tabell 2. Fordelingen av vår- og høstutsett i de forskjellige produksjonsområdene (PO1-8).

Produksjonsområde (PO)	Høstutsett	Vårutsett
1&2	28	3
3	49	19
4	122	71
5	28	44
6	158	213
7	27	23
8	58	68

7.1.4.3 Behandlinger mot bendelorm

Det ble registrert 98 behandlinger i spørreundersøkelsen, der 58 hadde god effekt, mens 40 hadde begrenset til ingen effekt. Det ble behandlet på 63 lokaliteter og fra 44 av disse ble det rapportert om god effekt, mens 23 rapporterte om begrenset til ingen effekt. Det var 5 lokaliteter som rapporterte både god og begrenset til ingen effekt på to eller flere behandlinger i forskjellige kohorter. Ingen forklaringskraft ble funnet for noen av variablene. I denne analysen ble det også undersøkt om det var noen forskjeller i behandlingseffekt mellom produksjonsområder, men dette ble ikke påvist. Dette kan skyldes at det ikke er noen sammenheng, eller at datasettet er for begrenset til å si noe. Våre resultater viser uansett at behandlinger er utbredt i hele det området hvor parasitten er vanlig forekommende i oppdrettsfisk.

7.1.4.4 Oppsummering av svar fra resistens

Det var planlagt å gjennomføre resistenstesting mot praziquantel med bioassay på lokaliteter i prosjektet i 2019. Dette ble ikke utført da koronapandemien gjorde at det var forbud mot besøk av utenforstående på oppdrettsanleggene i perioden 2019 - 2021. Det var et eget spørsmål om resistens i spørreskjemaet (Kapittel 7.1.3.1), hvor det kun kom inn informasjon om 6 utførte resistenstester. Fire av disse konkluderte med "ikke resistens" og to tester med at resistens var påvist. Utover det faktum at det viser at resistens er tilstede så er det ikke noe mer informasjon å trekke ut av så få datapunkter. Dersom dårlig effekt av behandling skyldes resistent bendelorm (Kapittel 7.1.4.3), så gir dette et bedre bilde av utbredelsen av resistens. Andre årsaker til dårlig behandlingseffekt, kan imidlertid være for lav dosering av medisin eller at fisken ikke har spist nok av medisinfôret. Kartet viser at det ikke er noe annet system i dette annet enn at redusert effekt ikke er påvist nord for Hitra-Frøya i PO6. Årsaken til at det ikke ble registrert effekter av behandling i PO2 og få registreringer i PO3, er at den største fiskehelsetjenesten i disse områdene ikke ville delta i spørreundersøkelsen.

7.2 Del 2: Diagnostikk, populasjonsgenetikk og genomikk

Ansvarlig for aktivitet: Haakon Hansen

Bidragstere: Christoph Hahn, Bjørn Spilsberg, Saima N. Mohammad, Egil Karlsbakk, Sigmund Sevatdal

7.2.1 Introduksjon

Eubothrium crassum (Klasse Cestoda, Orden Bothriocephalida) er per i dag beskrevet som en art som infiserer laks, *Salmo salar* (i ferskvann og sjøvann), ørret, *Salmo trutta* (i ferskvann og sjøvann) og regnbueørret, *Onchorhynchus mykiss*. En annen art, *E. salvelini*, finnes i røye, *Salvelinus alpinus*, og bekkerøye, *Salvelinus fontinalis* (Scholz et al., 2003). *Eubothrium crassum* er ikke funnet i røye og *E. salvelini* er ikke funnet i laks, mens regnbueørret kan bære infeksjoner med begge artene (Scholz et al., 2003). Det har vært og er fortsatt, spekulasjoner om de *Eubothrium*-parasittene som vi finner i sjø og ferskvann er én og samme art, og noen ganger kalles de fra sjø for *Eubothrium* sp. Det er imidlertid bare én gyldig art per i dag. Interessant er det at arten *E. crassum* ikke ble beskrevet fra noen av fiskeartene over, men fra en sikart, *Coregonus maraena* (Bloch, 1779) (eng. Maraena whitefish), fra innsjøen Miedwie i det nordvestlige Polen. Denne fiskearten er anadrom og har sin hovedutbredelse i Østersjøen.

Individer av *E. crassum* fra marine verter er oftest større enn de fra verter i ferskvann (Andersen and Kennedy, 1983), men denne og annen morfologisk variasjon reflekteres imidlertid ikke i den genetiske strukturen til *E. crassum* (som vist ved analyser av isoenzymmønstre og sekvenser av ITS rRNA-genene) (Kralova-Hromadova et al., 2003; Kralova et al., 2001; Snabel et al., 2004). *Eubothrium crassum* er mest sannsynlig av marin opprinnelse, men kan fullføre livssyklusen i ferskvann eller brakkvann (Hanzelova et al., 2002; Kennedy, 1978a; Rosen, 1919; Saksvik et al., 2001b). Dette faktum støttes av eksperimentell kryssinfeksjon av marine kopepoder med egg tatt fra gravide ormer fra ferskvannsverter og omvendt (Hodneland and Solberg, 1995; Kuchta et al., 2006). Selv om *E. crassum* regnes som én art i dag, har det vært begrenset forskning på parasittens populasjonsgenetikk. De genetiske markørene som har blitt brukt, selv om de er vanlige i taksonomiske/diagnostiske studier, har lav oppløsning (dvs. at de ikke varierer mellom arter eller mellom populasjoner innenfor en art). Mitokondrielle markører, som ofte har blitt benyttet innenfor både taksonomi, DNA strekkoding⁶ og fylogeografi⁷, er til nå lite benyttet for *Eubothrium*.

Et første innblikk i genomet til *E. crassum* kan i første omgang brukes til å studere de genetiske forskjellene mellom populasjoner av *Eubothrium* for å avgjøre om det er én eller flere arter, og om vi har forskjeller mellom populasjoner av parasitten langs norskekysten. Dette er også av stor interesse for havbruksnæringen, blant annet når oppdrettere de skal velge riktige behandlingsstrategier. Hvis vi kan fastslå at det er samme art i ferskvann og saltvann, medfører det at det er en mulighet for at fisken kan ha med seg parasitter fra settefiskfasen. I motsatt fall med to adskilte varianter (f.eks. underarter), kan det være at ferskvannsvarianten ikke overlever lenge i laks i saltvann (Kennedy, 1978a). Da vil smitte fra settefisk være noe oppdretteren kan se bort fra. Genomiske data gir også tilgang til nye

⁶ DNA-strekkoding er en effektiv og praktisk metode for identifisering av arter hvor korte biter av en ukjent organismes arvestoff (DNA) identifiseres via sammenligning med DNA fra kjente arter i et kvalitetssikret DNA-bibliotek. Se på <https://ibol.org/>

⁷ Fylogeografi er studiet av de historiske prosessene som har resultert i nåværende geografiske fordelinger av slektslinjer. Man kan studere dette ved å se på den geografiske fordelingen av individer og deres populasjonsgenetikk.

markører som kan forbedre diagnostikken, blant annet ved å utvikle diagnostikk som kan gi informasjon om tilstedeværelse av forskjellige varianter av arten. Tilgang til genomiske data for parasitten vil også kunne brukes til å studere resistensmarkører (Le Clec'h et al., 2021) og være en første start på utvikling av nye kjemoterapeutika for behandling av denne parasitten (Olson et al., 2012). Oppsummert er det derfor et stort behov for mer inngående genetiske analyser av parasitten.

Estimering av prevalens i en populasjon og evaluering av behandlingseffekt utføres i dag ved disseksjon av fisken og telling av antall bendelorm, enten ved å 1) vurdere hyppigheten av bendelorm i populasjonen før og etter behandling, hvor fisken registreres som enten positiv eller negativ (tilstedeværelse eller fravær), eller 2) ved å telle antall parasitter i hver fisk så nøyaktig som mulig. Det å anslå tilstedeværelse eller fravær er det mest vanlige da det å telle nøyaktig antall parasitter er tidkrevende, krever mer utstyr og ikke kan gjøres på merdkanten. Å basere seg på tilstedeværelse eller fravær medfører også en usikkerhet, da en behandling vil kunne gi f.eks. 90 % reduksjon i antall parasitter, men ikke fjerne alle parasitter. I et slikt tilfelle vil en undersøkelse av tilstedeværelse i etterkant av behandlingen bli registrert som ingen effekt, da det fortsatt er parasitter tilstede. Begge disse alternativene resulterer uansett i at man må ta livet av et antall fisk for å få gjennomført undersøkelsen. Utvikling av ikke-invasive metoder for forskjellig påvisning av patogener har blitt mer og mer vanlig de siste årene. Blant annet har det blitt utviklet en metode for å påvise lakselus, *Lepeophtheirus salmonis*, i væskeprøver tatt fra magen til rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) (Eysturskarð et al., 2017) og for påvisning av *Paramoeba perurans* ved gjellesvabring (Downes et al., 2017). For å unngå unødvendige tap av fisk er utvikling av alternative, ikke - invasive metoder, ønskelig også for påvisning av bendelorm.

7.2.2 Problemstilling

Målet for denne delen av prosjektet var å studere om bendelorm i slekten *Eubothrium* fra ferskvann og saltvann er én og samme art og hvilken grad av genetisk variasjon det er mellom forskjellige populasjoner. Dersom det er samme art så betyr det at fisk kan infiseres i både ferskvann og sjøvann. I tillegg var det mål å utvikle en ikke-invasiv metode for å påvise *Eubothrium* i faecesprøver fra fisk slik, at denne metoden kan erstatte eller være supplementær til obduksjon som metode.

7.2.3 Materiale og metode, del 2.

7.2.3.1 Genomiske analyser, diagnostikk og taksonomi

For å få et helhetlig bilde av den genomiske variasjonen til bendelorm i slekten *Eubothrium* i laksefisk, ble prøver for helgenomsekvensering samlet inn fra flere forskjellige lokaliteter i Europa, men med et sterkt fokus på Norge (se Figur 6 og Tabell 3). Datasettet inkluderte prøver fra laks og regnbueørret fra oppdrett i sjø, og fra anadrome og ferskvannsresidente populasjoner av ørret, tatt i sjø, elv og innsjøer⁸. Som utgrupper⁹ inkluderte vi tre prøver av *E. salvelini* fra røye, *Salvelinus alpinus*. For hver prøve som ble inkludert ble det tatt ut en bit

⁸ Vi ønsket i utgangspunktet å inkludere prøver av *Eubothrium* sp. fra *C. maraena* da dette er typeverten for *E. crassum*, men det ble kun funnet én parasitt i et utvalg på 15 individer av fisk og denne viste seg å være arten *Proteocephalus longicollis*.

⁹ En utgruppe i fylogenetiske analyser er en art som ikke er nært beslektet med de organismene som studeres (inngruppen). Utgruppen fungerer som en referansegruppe når de evolusjonære relasjoner i inngruppen skal studeres.

av parasitten, men resten av parasitten, inkludert scolex, ble tatt vare på som referansemateriale.

Prøvene ble sendt til helgenomsekvensering hos MacroGen (<https://dna.macrogen.com/>) og all preparering av prøvene før sekvensering i tillegg til all bioinformatikk ble gjennomført ved Universitetet i Graz, Østerrike. Detaljert beskrivelse (på engelsk) av DNA-ekstraksjon, sekvensering og bioinformatikk finnes i Appendiks (14.1). I kort ble fire prøver sekvensert i detalj (prøve 3, 6, 7 og 19 i Tabell 3) og satt sammen til referansegenomer som de andre genomene senere ble sammenlignet med. Fra de ferdige genomene ble det mitokondrielle genomet ekstrahert og det ble konstruert en fylogeni (slektskapsanalyse) basert på dette datasettet separat. Deretter ble det utarbeidet en fylogeni for alle prøver basert på sammenligninger av hele genomet. I tillegg ble det blant annet gjort spesifikke søk etter kandidatgener som tidligere er rapportert å være assosiert med resistens mot praziquantel (Le Clec'h et al., 2021).



Figur 6. Kart som viser lokalitetene for prøver brukt til genomanalyser av bendelorm i slekten *Eubothrium*. Se tabell 1 for detaljer.

Tabell 3. Oversikt over prøver som ble samlet inn til de genetiske analysene, med dato (år) for innsamling, vert, lokalitet, fylke/region, land, lokalitetens utløp i sjø, habitat, biologien til fisken og sekvenseringsteknologi og mengde data sekvensert per prøve for de forskjellige teknologiene. **Verter:** *S. salar* = *Salmo salar* (Atlantisk laks), *S. trutta* = *Salmo trutta* (ørret), *O. mykiss* = *Oncorhynchus mykiss* (regnbueørret). **Land:** NO= Norge, DK=Danmark, SE=Sverige, AT=Østerrike, EE=Estland, RU=Rusland. **Habitat:** F=Ferskvann, S=Saltvann, B=Brakkvann. **Utløp i hav:** ATL=Atlantehavet, Øst=Østersjøen, Kvit=Kvitsjøen, Sva=Svartehavet. **Type fisk:** Vst=Villfisk, stasjonær, Van=Villfisk, anadrom, Vs=Villfisk, sjø, Opp=oppdrett. *: resultater for denne prøven var ikke mottatt fra sekvenseringsfirmaet da rapporten ble skrevet.

Nr	Dato	Vert	Lokalitet	Fylke/region	Land	Habitat	Hav	Type fisk	Illumina reads [Gbp]	long reads [Gbp]	RNAseq [Gbp]
1	2019	<i>O. mykiss</i>	Oppdrettsanlegg	Hordaland	NO	F	Atl	Opp	20		
2	2021	<i>S. alpinus</i>	Hallstaetter See	Hallstatt	AT	F	Sva	Vst	20		
3	2020	<i>S. alpinus</i>	Kjemsjøen, Alvdal	Innlandet	NO	F	Atl	Vst	90	30	
4	2021	<i>S. alpinus</i>	Onegasjøen	Karelen	RU	F	Øst	Vst	20		5
5	2019	<i>S. salar</i>	Bornholm	Bornholm	DK	S	Øst	Van	20		
6	2017	<i>S. salar</i>	Oppdrettsanlegg	Rogaland	NO	S	Atl	Opp	90		5
7	2018	<i>S. salar</i>	Oppdrettsanlegg	Trøndelag	NO	S	Atl	Opp	90		
8	2019	<i>S. salar</i>	Enningdalselva	Viken	NO	F	Atl	Van	20		
9	2016	<i>S. salar</i>	Skibotnelva	Troms	NO	F	Atl	Van	40		
10	2017	<i>S. salar</i>	Stjørdalselva	Trøndelag	NO	F	Atl	Van	40	30	
11	2016	<i>S. salar</i>	Rosendal	Hordaland	NO	F	Atl	Van	20		
12	2017	<i>S. salar</i>	Gaula	Trøndelag	NO	F	Atl	Van	40		
13	2017	<i>S. salar</i>	Kinso	Hordaland	NO	F	Atl	Van	20		
14	2017	<i>S. salar</i>	Ådland	Hordaland	NO	F	Atl	Van	20		
15	2017	<i>S. salar</i>	Drammenselva	Viken	NO	F	Atl	Van	20		
16	2021	<i>S. salar</i>	Onegasjøen	Karelen	RU	F	Øst	Vst	20		
17	2021	<i>S. trutta</i>	Hallstaetter See	Hallstatt	AT	F	Sva	Vst	20		
18	2021	<i>S. trutta</i>	Palli, Hiiuma Island	Võru County	EE	B	Øst	Van	20		
19	2012	<i>S. trutta</i>	Fustvatnet	Nordland	NO	F	Atl	Vst	90		
20	2016	<i>S. trutta</i>	Rosendal	Hordaland	NO	F	Atl	Van	20		
21	2009	<i>S. trutta</i>	Skjebergkilen	Viken	NO	S	Atl	Vsj	20		
22	2019	<i>S. trutta</i>	Storsjøen, Rendalen	Innlandet	NO	F	Atl	Vst	20		
23*	2021	<i>S. trutta</i>	Imandrasjøen	Murmansky oblast	RU	F	Kvit	Vst	20		5
24	2021	<i>S. trutta</i>	Åkersjön	Jämtland	SE	F	Øst	Vst	20		

7.2.3.2 Utvikling av en ikke-invasiv metode for påvisning av bendelorminfeksjoner i fisk

Prøver

Tabell 4. Prøver benyttet i utvikling og testing av metode for en ikke-invasiv påvisning av bendelorminfeksjoner i fisk.

Prøve	Formål	Art	n	Lokalitet	Vert
Vev	sensitivitet og optimalisering	<i>Eubothrium crassum</i>	2	Oppdrettsanlegg, Rogaland	<i>Salmo salar</i>
Vev	spesifisitet	<i>Eubothrium salvelini</i>	1	Kjemsjøen, Innlandet	<i>Salvelinus alpinus</i>
Vev	spesifisitet	<i>Schistocephalus solidus</i>	1	Luktvatnet, Nordland	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Vev	spesifisitet	<i>Dibothriocephalus ditremum</i>	1	Fustvatnet, Nordland	<i>Salvelinus alpinus</i>
Vev	spesifisitet	<i>Dibothriocephalus dendriticum</i>	1	Luktvatnet, Nordland	
Vev	spesifisitet	<i>Proteocephalus longicollis</i>	1	Risør, Agder	<i>Coregonus lavaretus</i>
Vev	spesifisitet	<i>Salmo salar</i>	1	NIVA, Solbergstrand	-
Vev	spesifisitet	<i>Salmo trutta</i>	1	Luktvatnet, Nordland	-
Vev	spesifisitet	<i>Salvelinus alpinus</i>	1	Luktvatnet, Nordland	-
Vev	spesifisitet	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	Akvariet, VI ¹	-
Svaber	spesifisitet og felttest	<i>Salmo salar</i>	10	VESO ²	-
Svaber	felttest	<i>Salmo salar</i>	13	Oppdrettsanlegg, Rogaland ³	-

¹ Prøver tatt fra fisk som var avlivet i forbindelse med et annet forsøk.

² Sertifisert patogenfri fisk. Prøver tatt fra fisk som var avlivet i forbindelse med et annet forsøk.

³ Tatt ut fra anlegg C i kohortstudien (se Figur 12)

Alle svaberprøver ble tatt med COPAN FLOQSwabs, 520CS01 (COPAN). Svaberprøvene fra VIKAN ble tatt direkte på fisk som nylig var avlivet. Den avlivede fisken ble lagt på et rent papir og utsiden av fisken ble tørket av før prøven ble tatt fra gattåpningen og den bakerste delen av tarmen. For svaberprøver tatt ut under kohortstudien, ble prøvene tatt fra den bakerste delen av tarmen, noe som i praksis tilsier gattåpningen, etter at innvollene var dissekert ut av fisken. I begge tilfeller ble prøvene tatt ved å rotere svaberen 5-10 ganger i tarmen, langs slimhinnene, før svaberen ble tatt ut og fiksert i 70% EtOH.

DNA-ekstraksjon

DNA-ekstraksjon av vevsprøver

Ekstraksjon av vevsprøver ble ekstrahert med DNeasy kit på et QiaCube ekstraksjonsinstrument (Qiagen®) i henhold til instruksjonene fra produsenten.

DNA-ekstraksjon av svaberprøver

Før ekstraksjon ble svabrene fjernet fra væsken og mesteparten av væsken ble sugd av med en pipette før resten ble fordampet på en varmeblokk. Bunnfallet ble deretter ekstrahert med DNeasy kit på et QiaCube ekstraksjonsinstrument (Qiagen®) i henhold til instruksjonene fra produsenten.

Assay design og optimalisering

To forskjellige assays ble utviklet; ett som påviser 18S ribosomalt DNA og ett som påviser DNA fra det mitokondrielle genet cytokrom oksidase I. PCR design ble gjort i programmet Primer 3 pluss (Untergasser et al., 2007). For å designe et 18S rRNA genassay ble en sekvens fra *Eubothrium crassum*, AJ287509, lastet ned fra GenBank og alignet med 18S-sekvenser fra andre nær beslektede arter. På bakgrunn av dette alignmentet ble det designet et spesifikt assay. Primere og prober er gitt i Tabell 5 og assayet for 18S amplifiserer en sekvens på 120 nukleotider. Spesifisitet ble sjekket *in silico* med Primer-BLAST (Ye et al., 2012) og denne analysen viste at primere og probe hadde 100% treff på *E. crassum* og *E. salvelini*. I og med at *E. salvelini* er en parasitt som i hovedsak infiserer røye i ferskvann og aldri forekommer i laks vil dette ikke representere et problem for bruk av assayet i oppdrettslaks i saltvann.

Av andre treff viste analysen at det kun var to nukleotider forskjell i revers primer til *E. fragile* (KR780946.1). Vi antar at denne arten dermed ville bli fanget opp av vårt assay hvis den var tilstede. Da *E. fragile* kun er påvist i stamsild, *Alosa fallax*, så anser vi heller ikke dette som noe praktisk problem for bruk av assayet i oppdrettslaks i saltvann. *Eubothrium rugosum* (KR780961) og *E. tulipai* (KR780951) viste 3 nukleotider forskjell i revers primer og det er derfor usannsynlig at de ville fanges opp av assayet.

For design av COI-assayet brukte vi sekvensen KR780781 fra *Eubothrium crassum* som basis for design. Alle COI-sekvenser fra *Eubothrium* spp. og nært beslektede arter i GenBank, i tillegg til COI-sekvenser fra *Eubothrium* spp. som ble fremskaffet i dette prosjektet (se under genomikk over) ble brukt. Dette alignmentet ble så brukt for å designe et COI assay. Primere og prober er gitt i Tabell 5 og assayet for COI amplifiserer en sekvens på 130 nukleotider. Spesifisitet for primere og probe ble også for dette assayet sjekket *in silico* med Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Denne analysen viste at det nærmeste treffet var mot *E. salvelini*, KR780824, hvor det var tre nukleotider forskjell i forward primer, to i proben og fem i revers primer, noe som tilsier at assayet ikke vil fange opp denne arten eller andre arter. Et Primer-BLAST-søk begrenset til orden Bothriocephalidea ga ingen flere treff som kunne gi et signal. *In silico*-spesifisitetsanalysen indikerer at dette assayet har høy spesifisitet.

Tabell 5. Primere og prober for sanntids-PCR-påvisning av ribosomalt 18S DNA og mitokondrielt Cytokrom oksidase I (COI) DNA fra *Eubothrium crassum* utviklet i dette prosjektet.

Mål/gen	Navn	Primer/probe	Sequence (5'-3')
<i>E. crassum</i> 18S	Eub-F	Forward	[REDACTED]
	Eub-R	Revers	[REDACTED]
	Eub-P	Probe	FAM-[REDACTED]BHQ1)
<i>E. crassum</i> COI	Eub4-F	Forward	[REDACTED]
	Eub-3R	Revers	[REDACTED]
	Eub3-pr	Probe	HEX-[REDACTED]BHQ1)

BHQ = Black Hole Quencher. Primer og probesekvenser vil bli offentliggjort etter at de er publisert i en vitenskapelig artikkel.

Sanntids-PCR-protokoll for påvisning av Eubothrium crassum i svaberprøver fra fisk
Assayene ble satt opp for å kjøres som duplex PCR hvor proben for 18S var FAM-merket og proben for COI var HEX-merket. Alle analysene ble utført med Brilliant III ultrafast QPCR mastermix (Agilent) med følgende PCR program: enzym-aktivering i 3 minutter ved 95 °C, fulgt av 45 sykluser på 10 sekunder ved 95 °C og 20 sekunder ved 60 °C. Testen med temperaturgradient (se under) ble kjørt på et CFX96 instrument (Bio-rad) og alle andre kjøringene ble gjennomført på et Aria MX instrument (Agilent). Alle Cq-verdier over 39 ble ansett som negative.

Det ble kjørt en gradient PCR hvor annealingtemperaturen varierte fra 55 til 65 °C. Assayet for 18S viste like Cq-verdier for alle temperature, mens Cq-verdiene for COI-assay var konstante fra 57 til 63 °C. Basert på gradient-PCR-eksperimentet utført som beskrevet i materiale og metoder, ble en annealingtemperatur på 60 °C valgt (resultater ikke vist).

DNA- ekstrakter fra to prøver som var morfologisk identifisert som *E. crassum* ble brukt til å lage fortynningsrekker på 1x til 100000x fortytning og disse ble analysert to ganger med tre replikater hver gang. Analysen av fortynningskurvene viste at amplifikasjonseffektiviteten var 98,3 % for 18S-assayet og 91,4 % for COI-assayet. Linearitet uttrykt som R² ble bestemt til å være over 0,995 for begge analysene (Tabell 6). Amplifikasjonseffektivitet og linearitet for de to PCR-analysene ble begge derfor funnet å være akseptable.

Tabell 6. Amplifikasjonseffektivitet og linearitet for de to PCR-metodene målt ved analyse av to 10x fortynningskurver med 5 fortyninger hver

Prøve	Eksperiment	18S E, %	18S R ²	COI, E, %	COI R ²
Prøve 1	1	103.4	0.998	86.4	0.998
Prøve 2	1	79.9	0.995	87.1	0.999
Prøve 1	2	116.6	0.994	94.2	0.998
Prøve 2	2	93.2	0.998	97.9	0.997
Gjennomsnitt		98.3	0.996	91.4	0.998

7.2.4 Resultater og diskusjon

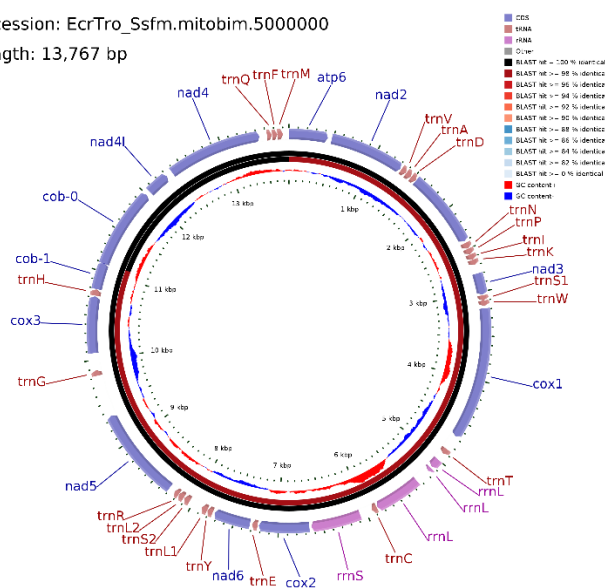
7.2.4.1 Genomiske analyser, diagnostikk og taksonomi

Resultatene fra de genomiske analysene er beskrevet i detalj (på engelsk) i Appendix 14.1 og gis som et kortere sammendrag her.

Komplette mitokondrielle genomer ble konstruert for alle 23 isolater av *Eubothrium* som ble sekvensert (Tabell 3). Gjennom en automatisert annotering og påfølgende manuell kurering av disse mitokondrielle genomene ble det konsekvent identifisert 12 kodende-, 2 rDNA- og 22 tRNA-gener. Genene og deres organisering er som tidligere rapportert for representanter for ordenen Bothriocephalidae og er vist i Figur 7.

Accession: EcrTro_Ssfm.mitobim.5000000

Length: 13,767 bp



1. BLAST EcrTro_Ssfm_20k vs EcrTro_Ssfm_w_sabim_5000000
 2. BLAST EcrTro_Ssfm_20k vs EcrTro_Ssfm_genbankcelle_2020000

Figur 7. Figur som viser organiseringen av det mitokondrielle genomet til *Eubothrium crassum* fra en oppdrettslaks, *Salmo salar*.

Videre ble kjernegenomene for fire isolater av *Eubothrium crassum* og ett for *E. salvelini* satt sammen (assembled) *de novo*. Dette er de første genomene fra denne ordenen av bendelorm. Genomstørrelsen var på ca 420 Mbp og av god kvalitet. Det annoterte genomet til menneskets brede bendelorm, *Dibothriocephalus latus*, er av sammenlignbar størrelse, 531 Mbp, men ikke av like høy kvalitet. Genomene for de andre isolatene ble så satt sammen og annotert ved hjelp av disse fire referansegenomene.

Antallet predikerte gener var relativt konsistent, og varierte fra 17800 til 22000. Totalt sett identifiserte vi 10411 ortologe¹⁰ genklynger i alle fire isolatene. 3243 genklynger inneholdt paraloger¹¹ i minst ett isolat av *E. crassum*. Foreløpige analyser viser at det ble identifisert et større antall gener i *Eubothrium*-isolater fra marin oppdrettslaks, noe som ser ut til å være forårsaket av et økt antall gendupliseringer. Faktisk inneholdt 353 ortologe genklynger konsekvent et høyere kopitall i isolater fra oppdrettslaks, sammenlignet med isolater fra innlandsørret.

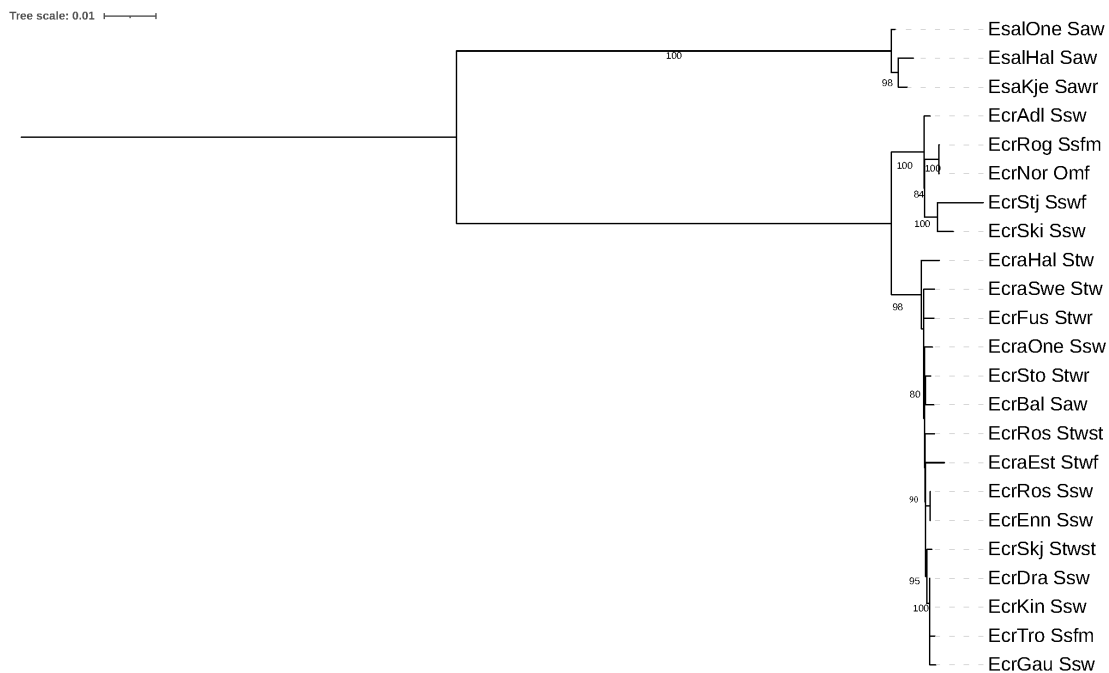
Slektskapsanalysen som er basert på hele settet av 23 mitokondrielle genomer med 12 mitokondrielle kodende, pluss 12S og 16S ribosomale gener, og 18S rDNA er vist i Figur 8. Her er *E. crassum* delt inn i to godt støttede grupper. Den ene gruppen inneholder utelukkende isolater fra norsk atlantisk laks, mens den andre inneholder isolater fra laks og ørret over hele den europeiske utbredelsen, inkludert Norge.

¹⁰ Ortologer er homologe gener som eksisterer i forskjellige arter og havnet der som følge av at forfaderen de oppstod i dannet nye arter. Disse genene har ofte like funksjoner i de forskjellige organismene. Ferizi, Susanna: homologe gener i Store norske leksikon på snl.no. Hentet 24. april 2022 fra https://snl.no/homologe_gener

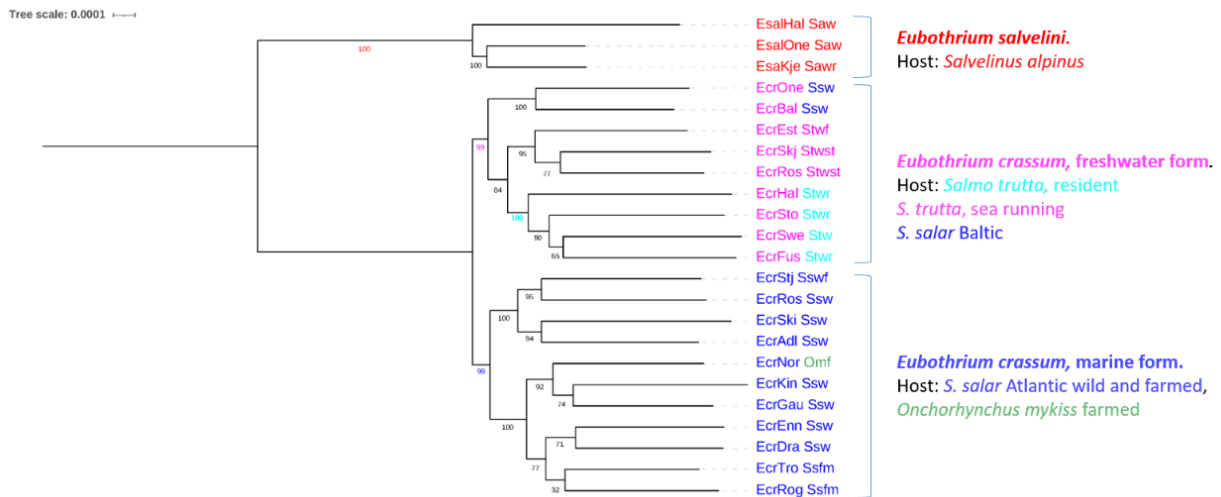
¹¹ Paraloge gener er homologe gener som oppstod som en kopi hos en forfader og blir funnet i flere forskjellige organismer eller de kan være kopier av gener som allerede eksisterer i en organisme. Paraloge gener vil som regel ha forskjellige funksjoner i hver organisme selv om de stammer fra en felles forfader. Ferizi, Susanna: homologe gener i Store norske leksikon på snl.no. Hentet 24. april 2022 fra https://snl.no/homologe_gener

Det ser ikke ut til å være et klart mønster med hensyn til geografisk fordeling eller vertsrelevante faktorer som ligger bak disse grupperingene. Den mest sannsynlige forklaringen er at gruppene representerer genetiske linjer som stammer fra separate istidsrefugier, som har spredt seg til Norge uavhengig etter det siste istid.

Alle de 23 kjernegenomene ble også brukt i en slektskapsanalyse, og denne analysen baserte seg på en sammenligning (alignment) av 3300 gener og totalt 1279066 bp. Analysen (Figur 9) viser at *Eubothrium* sp. som infiserer stor villaks og oppdrettslaks (og regnbueørret) i sjø og *E. crassum* i ørret (både sjøørret og fra innsjøer) og fra laks i Østersjøen, er én og samme art, *E. crassum*. Også denne analysen deler isolatene inn i to adskilte og godt støttede genetiske grupperinger. Denne grupperingen er imidlertid ikke kongruent med den som fremkom basert på analyser av mitokondrielt DNA, men synes å representere en form knyttet til ferskvann og en marin form av *Eubothrium crassum* (henholdsvis rosa og blå i Figur 9). «Ferskvannsformen» ble også påvist i baltisk laks (brakkevann). Det kan tenkes at de i dag er så tilpasset forskjellige copepodverter i sine respektive miljøer at livssyklusen ikke vil fullføres i et annet miljø.

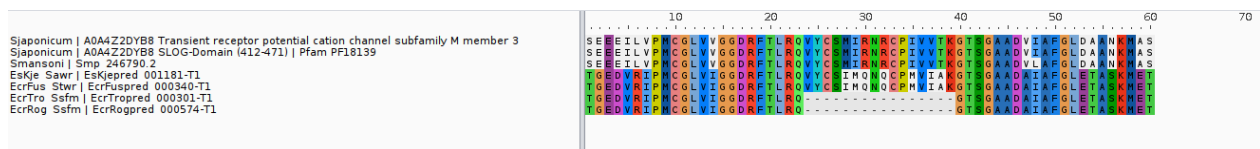


Figur 8. Slektskapsanalyse basert på hele det mitokondrielle genomet fra 20 isolater av *Eubothrium* (Esal=*E. salvelini*, Ecra=*E. crassum*), fra forskjellige verter (Sa=*Salvelinus alpinus*, Ss=*Salmo salar*, St=*S. trutta*) og geografiske lokaliteter. Tre isolater av *E. salvelini* fra røye (*S. alpinus*) er brukt som utgruppe i analysen.



Figur 9. Slektskapsanalyse basert på genomiske data av 20 individer av *Eubothrium* fra forskjellige verter og geografiske lokaliteter. Tre isolater av *E. salvelini* fra røye (*Salvelinus alpinus*) er brukt som utgruppe i analysen. Fargene på benevnelsen til de forskjellige individene representerer art av *Eubothrium* (Esal=*E. salvelini*, Ecr=*E. crassum*), fiskevert (Sa=*S. alpinus*, Ss=*Salmo salar*, St=*S. trutta*) og gruppering i treet og er forklart til høyre i treet.

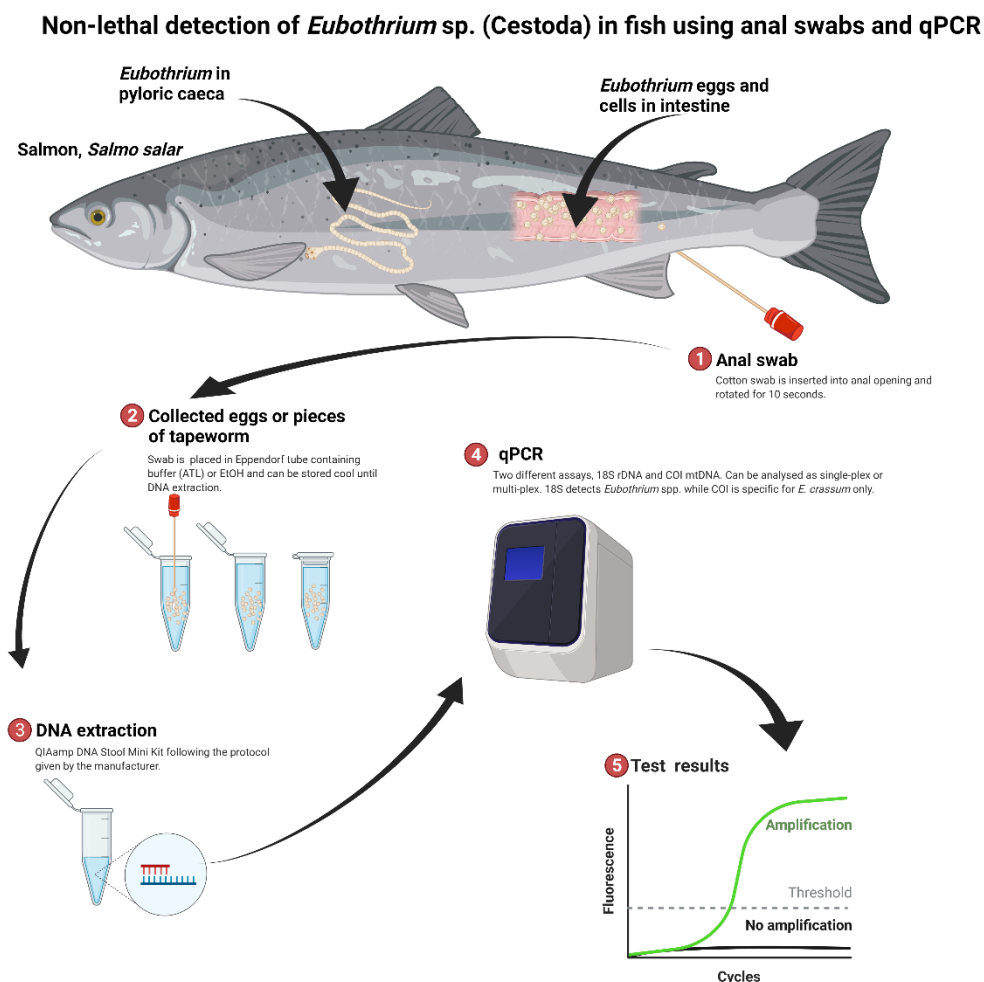
Vi har også identifisert ortologe gener for *transient receptor potential cation channels*, TRP, som antas å være mål for Praziquantel, inkludert genet TRPMPZQ (Smp_130890) som nylig er funnet å være involvert i resistens mot Praziquantel i *Schistosoma mansoni* (Le Clec’h et al., 2021). I tillegg viser resultatene at i denne ortologe genklyngen er TRPM1 (Smp_198800.1), som er fylogenetisk nærmest TRPMPZQ (Bais and Greenberg, 2020), duplisert i begge isolatene fra oppdrettslaks, mens representert med bare en enkelt kopi hver i de to isolatene fra innlandsørret. I tillegg viser de prediksjonene som er gjort at TRPMPZQ-ortologene i isolater fra oppdrettslaks ser ut til å mangle betydelige deler av SLOG-domenet (Figur 10). Sistnevnte antas å spille en regulatorisk rolle for TRP i potensiell gjenkjennelse av et universelt nukleotid eller nukleotid-avledet ligand (Burroughs et al., 2015). Hvorvidt noen av disse funnene er kausalt knyttet til bruken av og spiller en rolle i begynnelsen av resistens mot Praziquantel kan ikke sies sikkert basert på dette studiet, men må undersøkes videre.



Figur 10. En sammenstilling (alignment) av SLOG-domenet fra *Schistosoma japonicum* (n=2), *S. mansoni* (n=1), *Eubothrium salvelini* (n=1), *E. crassum* fra innlandsørret, *Salmo trutta* (n=1) og *E. crassum* fra oppdrettslaks, *S. salar*, i sjø (n=2). Figuren viser at deler av domenet mangler hos de to individene fra oppdrettslaks.

7.2.4.2 Ikke-invasiv metode for påvisning av bendelorminfeksjoner i fisk

For å unngå at fisk må ofres for å påvise infeksjoner med bendelorm, har vi utviklet en ikke-invasiv metode for påvisning av *Eubothrium crassum* i fisk ved bruk av svaberprøver tatt fra gattåpningen kombinert med en sanntids-PCR. Metoden er illustrert i Figur 11 og består av prøvetaking med svabre fra gattåpningen (1+2), DNA ekstraksjon (3) og påvisning med sanntids-PCR (4+5).



Figur 11. Illustrasjon av ikke-invasiv metode for påvisning av bendelorminfeksjoner i fisk. Metoden består av prøvetaking med svabre fra gattåpningen (1+2), DNA ekstraksjon (3) og påvisning med sanntids-PCR (4+5). Designet i BioRender.com

Spesifisitet

Spesifisitet for sanntids-PCR-assayet ble analysert i to eksperimenter; én dedikert analyse hvor det ble testet for påvisning av *E. salvelini* og én analyse hvor assayene ble testet på DNA fra andre bendelorm og laksefisk. Siden spesifisitetsanalysen som ble utført *in silico* indikerte at *E. salvelini* vil bli påvist med 18S-analysen, men ikke ved COI-analysen, analyserte vi DNA fra *E. salvelini* isolert fra røye (Tabell 7). Resultatene viste at 18S-assayet, som indikert av spesifisitetsanalysen utført *in silico*, effektivt påviser *E. salvelini*, mens COI-assayet ikke ga noen positive resultat.

Tabell 7. Sanntids-PCR-resultater for analyser av DNA fra *Eubothrium salvelini*

Prøve	Eksperiment	18S Cq-verdier	COI Cq-verdier
Prøve 3 (ufortynnet)	1	18.7/17.5/18.2	Ingen Cq/Ingen Cq/Ingen Cq
Prøve 3 (10X fortdynnet)	1	21.5/20.8/21.3	Ingen Cq/Ingen Cq/Ingen Cq
Prøve 3 (ufortynnet)	2	17.5/17.9/17.2	Ingen Cq/Ingen Cq/Ingen Cq
Prøve 3 (10X fortdynnet)	2	20.2/20.2/20.0	Ingen Cq/Ingen Cq/Ingen Cq

For å teste spesifisiteten mot andre bendelormer ble DNA fra vevsprøver av *Schistocephalus solidus*, *Dibothriocephalus ditremus*, *D. dendriticus* og *Proteocephalus longicollis* analysert (Tabell 4). For å teste om verts-DNA fra laksefisk kunne gi et falskt signal, ble DNA-ekstrahert fra *Salmo salar*, *S. trutta*, *Salvelinus alpinus* og *Oncorhynchus mykiss*-vev analysert (Tabell 4). Ingen av ekstraktene fra hverken laksefiskvev eller bendelorm ga signal for 18S eller COI (resultater ikke vist).

Felttester

Det ble gjennomført to felttester. Den første, som var en spesifisitetstest i felt, ble utført på DNA som var ekstrahert fra svaberprøver tatt fra gattåpningen til laks fra et forskningsanlegg som garanterer patogen-fri fisk. Disse 10 prøvene var negative for både 18S og COI (resultater ikke vist).

For å teste det utviklede assayet på feltprøver slik det er tenkt brukt i praksis, ble 13 svaberprøver tatt under kohortstudien analysert. For disse prøvene var antallet parasitter kjent fra obduksjon og prøvene ble valgt ut for å ha et maksimalt spenn i parasittbelastning. *Eubothrium crassum* ble påvist i alle prøver uavhengig av parasittbelastning (Tabell 8).

Tabell 8. Kvalitative resultater for sanntidsanalyser av 18S og COI for et sett med svaberprøver tatt fra laks med kjent infeksjon av *Eubothrium*. Negative kontroller er ikke vist i tabellen.

Prøve	18S assay (Påvist/antall analyser)	COI assay (Påvist/antall analyser)	Totalt parasittantall (n adulte i parentes)
1	4/4	4/4	72 (34)
2	3/4	3/4	30 (26)
3	4/4	4/4	8 (8)
4	4/4	4/4	3 (3)
5	4/4	4/4	67 (33)
6	4/4	4/4	6 (6)
7	3/4	4/4	12 (12)
8	4/4	3/4	5 (5)
9	1/4	3/4	25 (19)
10	4/4	4/4	5 (5)
11	4/4	4/4	74 (37)
12	1/4	4/4	23 (21)
13	4/4	4/4	4 (4)

En visuell inspeksjon av resultatene med hensyn på korrelasjon mellom parasittantall og Cq-verdier viser at det ikke er noen korrelasjon (data som ligger til grunn for Tabell 8). Prøvetaking av faeces vha svabre reflekterer derfor ikke kvantitativt antallet parasitter i tarmen. Imidlertid korrelerte de kvalitative dataene, dvs. påvisning og ikke påvisning, godt.

Det er sannsynlig at DNA fra bendelormegg vil være det det påvises mest av ved bruk av en slik analyse på voksen fisk i felt og alle prøvene vi analyserte var fra fisk med adulte bendelorm i tarmen (se Tabell 8). Mangel på korrelasjon i analysene kan skyldes at frigjøringen av egg ikke skjer jevnt, og at det egg-antallet som til enhver tid er tilstede i tarmen derfor ikke reflekterer antallet bendelorm i fiskens pylorusblindsekker, eller at det i alle fall vil være svært stor variasjon mellom prøver tatt fra samme fisk på forskjellige tidspunkter. Hvorvidt en prøve tilfeldigvis inneholder en vevsbit fra bendelorm eller ikke vil også ha stor effekt på hvor mye parasitt-DNA som fanges opp på svaberen og følgelig også på målt Cq-verdi.

Metoden som er utviklet fungerer godt, og kan derfor være et viktig verktøy, spesielt for ikke-letal påvisning av forekomst eller estimering av prevalens av bendelorm i et oppdrettsanlegg. En kan bruke den når det skal vurderes om en behandlingstiltak skal settes inn og kanskje også for å vurdere effekten av behandlingen i etterkant. Kombinert med en bærbar sanntids-PCR maskin kan denne diagnostikken hvis ønskelig også gjennomføres på merdkanten. Hvis metoden skal brukes til evaluering av resultatet av en behandling så må dette testes på forhånd da dette ikke er gjort i dette studiet. Det er usikkerhet knyttet til hvor lenge det er egg eller andre spor av parasitten tilstede i en fisk etter en vellykket behandling, og metoden vil også kunne påvise eventuelle nye infeksjoner som har kommet til etter behandlingstidspunktet. Da denne metoden er sensitiv vil det derfor kunne påvises spor av parasitten selv om alle parasittene er døde eller har kommet ut av fisken. En slik test bør forslagsvis gjennomføres med uttak av prøver med forslagsvis 1, 3 og 5 uker etter behandling.

Sanntids-PCR-metoden kan også brukes for påvisning av DNA fra bendelorm i vannfilterprøver (miljø-DNA) og for å screene for mellomstadier av *Eubothrium* i mulige mellomverter. Svaberprøver og det DNA/RNA som kan ekstraheres fra disse, kan også testes for andre patogener slik som *Desmozoon lepeophtherii* og *Spironucleus* spp.. Da sanntids-PCR er mer sensitiv enn konvensjonell PCR og sekvensering, vil den også kunne benyttes til artsbestemmelse av *Eubothrium* fra formalinfikserte prøver, slik som f.eks. i histologiske snitt, hvor DNA ofte er degradert. I tillegg kan mageinnholdet bestemmes ut fra DNA ekstrahert fra svabrene og analyseres ved hjelp av meta-strekkoding (se f. eks. Guillerault et al., 2017). På den måten kan dietten til fisken analyseres og det kan også være mulig å identifisere hvilke av bendelormens potensielle mellomverter fisken har spist.

7.3 Del 3: Påvirkningen av infeksjoner med *Eubothrium* sp. på veksten og helsen til fiskeverten

Ansvarlig for aktivitet: Sigmund Sevatdal

Bidragstere: Egil Karlsbakk, Lars Qviller, Trine Sakariassen, Kristian Ruud, Hilde Welde, Saima N. Mohammad, Inga Rullestad, Hanne Log Persson, Regine Amanda Larsen, Kyrre Kausrud, Haakon Hansen.

7.3.1 Introduksjon

Oppdrettet Atlantisk laks kan være så kraftig infisert med bendelorm at blindsekker og tarm er kompakt fylt med en hvit masse av proglottider. Dette gir redusert plass til mat, og slike infeksjoner er teoretisk sett alvorlige for helsen og veksten til fisken (Boyce, 2011; Smith, 2011). Tidligere studier på konsekvensene av infeksjoner med bendelorm på vekst og helse hos oppdrettslaks (Bristow and Berland, 1991; Saksvik et al., 2001a) konkluderte med at langtidsinfeksjoner med *Eubothrium* sp. hadde en negativ innvirkning på veksten. Men da disse studiene ligger en del tilbake i tid, bør de undersøkes på nytt i lys av dagens fôr- og fôringsteknologi. Co-infeksjoner med bendelorm og andre patogener gi en økt negativ effekt og dette er for eksempel antatt å sees i infeksjoner hvor flagellaten *Ichthyobodo salmonis* og bendelorm forekommer sammen (Bristow and Berland, 1991). Infeksjoner med bendelorm kan også føre til en økt forekomst av deformiteter på grunn av redusert inntak av mikroelementer og det har vært vist i Finland at mennesker som er infisert med *Dibothriocephalus latus* har lavere nivåer av vitamin B12 (Nyberg et al., 1961).

7.3.2 Problemstilling

Målet for kohortstudien spesielt (se under) var å studere infeksjonsdynamikken til *Eubothrium crassum* i laks i norske oppdrettsanlegg i sjø. Det var også et mål å studere hva slags sammenheng det er mellom bendelorminfeksjoner og veksten og helsen til fiskeverten, f.eks. på hyppigheten av tapere i fiskebestanden.

7.3.3 Materiale og metode, del 3.

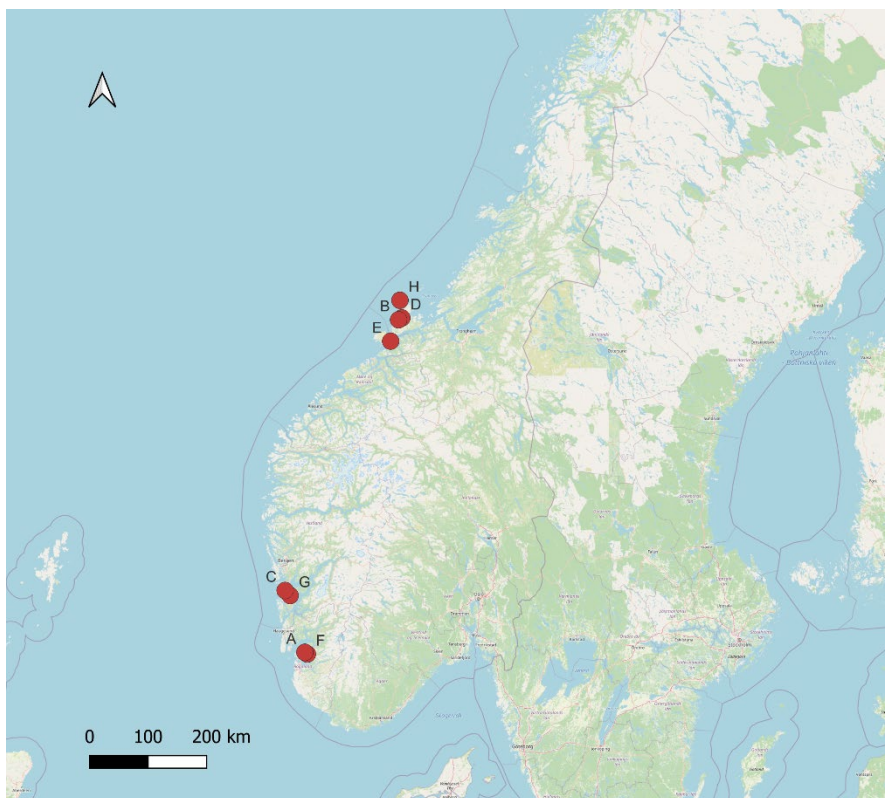
Denne delen ble gjennomført i nært samarbeid med MOWI AS og Lerøy Vest, som stilte med lokaliteter for kohortstudien for gjennomføring av feltstudier. I kohortstudien ble flere kohorter av fisk i lokaliteter fra områder med mye bendelorm (Sør-Vest Norge) fulgt fra ferskvannsstadiet til slakt. Prevalens og abundans av bendelorm på disse lokalitetene skulle relateres til data på vekst, helse og deformiteter. Som nevnte tidligere i rapporten, så inngår resultatene fra kohortstudien i flere deler av prosjektet, men er beskrevet i detalj her. Kohortstudien ble en stor del av prosjektet og det ble brukt betydelige ressurser på denne delen. Store deler av analysene ble gjennomført som to mastergradsprosjekter. Disse ble gjennomført av henholdsvis Kristian Ruud ved Universitetet i Bergen og Trine Sakariassen ved Universitetet i Tromsø i nært samarbeid med prosjektgruppen (link til mastergradsoppgavene finnes i kapittel 9).

MOWI skulle også bidra med historiske produksjonsdata fra sine anlegg, men prosjektet mottok begrensede mengder data og det var ikke mulig å gjøre analyser basert på de produksjonsdataene vi fikk. Vi brukte derfor *Havbruksdata* fra og med 2015 for denne analysen. En nærmere beskrivelse av materiale og metode for dette er vist i avsnitt 7.3.3.2.

7.3.3.1 Kohortstudie og infeksjonsdynamikk.

Lokaliteter og kohorter

For å studere infeksjonsdynamikken til *Eubothrium* sp. hos oppdrettslaks i sjøfasen ble åtte lokaliteter med dokumenterte tidligere infeksjoner med *Eubothrium* sp. valgt ut til kohortstudien (Tabell 9 og Figur 12). Lokalitetene lå i Rogaland, Hordaland og i Trøndelag rundt Hitra/Frøya. Flere av lokalitetene hadde flere kohorter og hver kohort ble gitt et nummer fra 1 - 14 (Tabell 9). Det ble lagt opp til at lokal veterinær/fiskehelsepersonell skulle ta ut prøver fra hver kohort i henhold til en detaljert protokoll som beskrev prøveuttaket i detalj. Kohortene ble fulgt i gjennom hele produksjonssyklusen, fra utsett i sjø til slakting. Første prøveuttak for hver kohort var fra ferskvann, da en positiv påvisning av bendelorm i disse prøvene ville medføre at kohorten ble ekskludert fra videre analyser.



Figur 12. Kart som viser plasseringen til oppdrettsanleggene som var en del av kohortstudien (se detaljer i Tabell 9).

Syv (7) kohorter ble satt ut i sjø om våren (mars - mai)(kohort 8-14 i Tabell 9) og syv om høsten (august - oktober)(kohort 1-7 i Tabell 9).

Tabell 9. Beskrivelse av lokaliteter og kohorter som var med i kohortstudien. Lokaliteter er vist på kart i figur 9. Fiskelengde er gjennomsnittslengde ved utsett.

Lokalitet	Kohort	Utsett sjø	Dato utsett	Fiskelengde (cm)	Merknad
A	1	Høst	15.09.2017	23,9	
A	2	Høst	15.09.2017	23,7	Ble ikke fulgt opp
B	3	Høst	20.09.2017	22,0	
C	4	Høst	24.10.2017	20,2	
C	5	Høst	08.09.2017	19,6	Prøveuttak ferskvann 20.10.17
C	6	Høst	14.10.2017	23,9	
D	7	Høst	17.08.2017	17,9	
E	8	Vår	20.03.2018	28,5	Utslaktet pga PD
E	9	Vår	01.05.2018	19,2	Utslaktet pga PD
F	10	Vår	08.04.2018	25,5	
G	11	Vår	05.04.2018	29,9	Satt ut på lokalitet G fra semilukket merd.
G	12	Vår	01.03.2018	25,5	
G	13	Vår	18.04.2018	19,3	
H	14	Vår	10.05.2019	18,2	Få parasitter

Planen for prøvetaking var å først ta ut prøver fra ferskvann før utsett, så én måned etter utsett i sjø (SV1) og deretter hver tredje måned (SV2, SV3 osv) frem til slakting. Tidsintervallet mellom uttakene varierte imidlertid noe av praktiske årsaker som blant annet dårlig vær og ferieavvikling. Perioden i havet varierte også og det samme gjorde antall prøvetakinger. Antallet fisk som ble prøvetatt var i utgangspunktet 30 tilfeldige individer, samlet inn fra faste merder. Fiskens gjennomsnittslengde (cm) ved utsett i er gitt i tabell 1. En oversikt over prøveuttakene finnes i Tabell 10.

Tabell 10. Tabell som viser dato for prøveuttak i kohortstudien. Antall fisk ved hvert prøvetaking var i utgangspunktet 30, med noen unntak: ^A:n = 22, ^B:n = 20, ^C:n = 18, ^D:n = 28, ^E:n = 27, ^F: n = 29, ^G:n = 21, ^H:n = 27, ^I:n = 21, og ^J:n = 18. Datoer som er understreket viser prøveuttak som ikke ble analysert (se teksten for forklaring).

Kohort	Ferskvann	1 mnd (SV1)	3 mnd (SV2)	6 mnd (SV3)	9 mnd (SV4)	12 mnd (SV5)	15 mnd (SV6)
1	07.09.2017	09.11.2017	30.01.2018	15.05.2018	21.08.2018	04.12.2018 ^A	-
2	07.09.2017	09.11.2017	<u>30.01.2018</u>	<u>15.05.2018</u>	<u>21.08.2018</u>	-	-
3	08.09.2017 ^B	26.10.2017	03.01.2018	24.04.2018	27.07.2018	30.10.2018 ^C	-
4	20.10.2017	05.12.2017	19.02.2018	11.05.2018	15.08.2018	16.11.2018	-
5	20.10.2017	05.12.2017	08.02.2018	11.05.2018	15.08.2018	16.11.2018	-
6	12.10.2017	05.12.2017	19.02.2018	11.05.2018	15.08.2018	<u>04.12.2018</u>	-
7	27.09.2017 ^D	01.11.2017	02.02.2018	02.05.2018 ^E	13.08.2018	-	-
8	12.03.2018	<u>12.04.2018</u>	<u>11.07.2018</u>	<u>12.11.2018</u>	-	-	-
9	23.04.2018	<u>21.06.2018</u>	<u>15.09.2018</u>	<u>12.11.2018</u>	-	-	-
10	10.04.2018	15.05.2018	17.08.2018	19.11.2018	20.03.2019 ^F	-	-
11	03.04.2018	12.06.2018	20.08.2018	15.10.2018	15.02.2019 ^G	-	-
12	28.02.2018	14.05.2018	20.08.2018	15.10.2018	15.02.2019	15.04.2019 ^H	-
13	18.04.2018 ^I	12.06.2018	20.08.2018	15.10.2018	15.02.2019	15.04.2019	31.07.2019
14	09.05.2019	27.08.2019 ^J	08.10.2019	09.12.2019	-	-	-

Enkelte prøveuttak (understreket i Tabell 10) ble av forskjellige årsaker ikke analysert; kohort 2 ble ikke analysert etter første prøveuttak i sjø da det ble funnet stor moden bendelorm i dette prøveuttaket, noe som ga mistanke om smitte i ferskvannsfasen. Kohortene 8 og 9 utgikk etter at anlegget fikk påvist PD, fisken ble slaktet ut, anleggene tømt og prøvene som var lagret nedfryst på anlegget ble destruert.

Det kan nevnes at kohortene 1, 4, 5, 6, 10, 11, 12 og 13 er også beskrevet i Ruud (2019) og Sakariassen (2019), men benevninger for lokalitet og kohort her er ikke samsvarende med disse.

Uttak av prøver og parasittologisk undersøkelse

Fisken ble avlivet med en overdose bedøvelse (benzokain/MS-222), før måling av lengde og vekt. Fisken ble så åpnet, og mage-tarm ble tatt ut og plassert i individuelt merkede plastposer der nummer på prøven korresponderte med lengde og vekt. Prøvene ble deretter dypfryst (-20 °C) frem til forsendelse. Prøver ble sendt frosset over natten til Universitetet i Bergen, Universitetet i Tromsø eller Veterinærinstituttet. De ble oppbevart nedfryst fram til undersøkelse.

Før undersøkelse ble hver prøve tint. Parasittene ble påvist med ulike metoder avhengig av størrelsen på prøven:

Liten fisk (15 - 200 g): Innholdet i pylorusblindsekkene ble undersøkt ved å klemme prøven mellom to petriskåler av glass og gjennomlyst under et stereomikroskop. Parasitter ble identifisert og senere fjernet ved å åpne caeca med saks. Dette ble gjort med forsiktighet for ikke å fragmentere større individer. Denne metoden ga gode resultater, men var en for

omfattende og tidkrevende prosess. Det ble tatt ut over 2200 prøver og de fleste skulle analyseres. Metoden ble derfor forenklet for større fisk.

Større fisk (200 g og større): Innholdet i pylorusblindsekkene ble vasket ut med vann, enten ved å plassere det på planktonduk (50 µm maskestørrelse) og vasket med kaldt vann fra springen, eller ved å presse det direkte ut i en glassbolle med kaldt vann. I bollen vil fettholdig innhold flyte eller synke til bunnen saktere enn bendelorm og dermed kunne skilles fra resten av innholdet. Etter skylling ble innholdet plassert i en stor petriskål med fysiologisk saltvann. Parasitter og parasittsegmenter ble plukket ut med pinsett. Innholdet ble også undersøkt med et stereomikroskop for små plerocercoider eller segmenter.

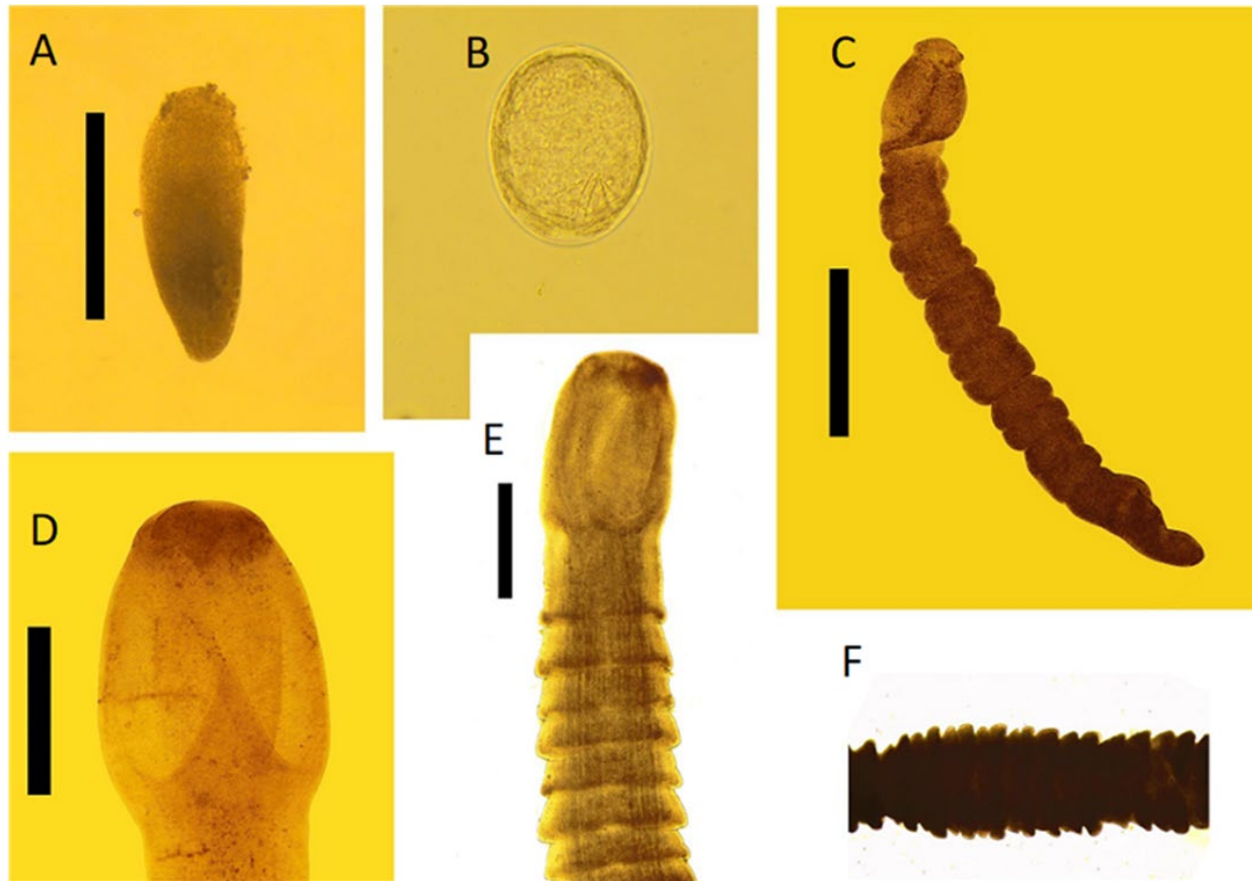
Parasittene ble plassert i petriskåler med fysiologisk saltvann, og antallet ble registrert. Antallet parasitter ble basert på antallet scolex eller i noen tilfeller, deler av innsnevring av strobila («nakkeregion») som åpenbart tilhørte en manglende scolex. Parasittene ble deretter kategorisert på grunnlag av størrelse og lengde beskrevet i Tabell 11. Nøyaktige lengdemålinger var vanskelig å få til for de store individene, fordi de hadde en tendens til å bli fragmentert. Det var imidlertid ikke komplisert i de fleste tilfeller å avgjøre om ormen tilhørte en av kategoriene i tabell 3. For å finne ut om parasittene var kjønnsmodne (gravide) eller ikke, ble seksjoner undersøkt ved å klemme mellom to petri-skåler av glass under et stereomikroskop for å undersøke egg i strobila. I større individer var tilstedeværelsen av egg ofte synlig for det blotte øye som strobila. Parasitter som ble funnet liggende fri i posen, ble antatt å være fra punkterte regioner i caeca.

Parasitter ble plassert på et tørkepapir i ti sekunder for å fjerne overflødig fuktighet. De ble deretter overført til liten plastskål og veid ved hjelp av en Mettler Toledo AB204 vekt til nærmeste 0,1 mg. En standardkurve lengde vs vekt ble konstruert ved å plukke ormer med ukontroversiell lengde, det vil si avrundet bakre strobila. Disse ble da veid individuelt. Standardkurven ble brukt til å estimere en vekt til svært små parasitter, som ikke lot seg veie men der det kunne måles lengde.

Tabell 11. Beskrivelse av kategorier for de ulike utviklingsstadiene av bendelorm.

Kategorier	Beskrivelse
Plero	Plerocercoid: ingen segmenter, tykkeste i midten. Størrelse: ca 0,3 - 0,6 mm
<1 (cm)	Juvenile 1: Liten, med scolex og strobila. Størrelse: 0,6 - 10 mm
1-5 (cm)	Juvenile 2: Med scolex og strobila. Ingen egg. Størrelse: 1 - 5 cm
>5	«Adult»: Med scolex og strobila. Ingen egg. Størrelse: > 5 cm + kjønnsmoden: Voksen med eggproduksjon.

Eubothrium sp. (jf. *E. crassum*) ble identifisert morfologisk i henhold til (Andersen and Kennedy, 1983), basert på den karakteristiske morfologien med sagtakket strobila, avlang scolex med bothrier og med en distinkt apikal hette. Ingen lignende cestoder er kjent å smitte norsk oppdrettslaks i sjøen. Figur 5 nedenfor presenterer et utvalg av livsstadiene til *Eubothrium* sp.



Figur 13. Stadier av *Eubothrium* sp. fra oppdrettslaks i sjø. A: Plerocercoid, B: Egg med hexacanth larve inni, denne har tre par kroker som er synlige. Egget måler ca 0.1 mm i lengde. C: Liten umoden (juvenil) bendelorm, scolex er utviklet med apical skive og sugefurer (bothria), og få proglottider. D: Scolex hos voksent individ. E: Scolex og nakkeregion av voksent individ. F: Segment med sagtakket strobila som er typisk for *Eubothrium crassum*. Målestokkene representerer 0.5 mm i bildene A, D, E og F, og 1 mm i C (fra Ruud, 2019).

Statistisk analyse

Begrepene prevalens og abundans («abundance») er brukt i samsvar med (Bush et al., 1997). Standard binomiske 95 % konfidensintervaller (Zar, 1984) ble utregnet for prevalensestimaterne. Bootstrappede 95% konfidensintervaller for gjennomsnittlig abundans ble estimert med den Microsoft Excel-baserte plattformen «Resample» (Wood, 2003). Statistiske analyser ble utført med Statistica 12.0, Fisher Exact tester (prevalens) og Mann Whitney tester (abundans), med mindre annet er oppgitt. Data ble ansett som signifikante når $P < 0,05$.

7.3.3.2 Påvirkning på vekst og fôrforbruk

Resultater, dvs lengde og vekt fra kohortstudien ble benyttet til å evaluere effekter av infeksjon med bendelorm. Prøveuttaket er derfor beskrevet i avsnitt 7.3.3.1. Lengde

(gaffellengde) og vekt ble registrert ved hvert prøveuttak. Prøvene er tatt ut til ulik tid, og med ulik tidsperiode mellom uttakene (Tabell 10). Dette gjør at resultatene for vekt ikke er direkte sammenlignbare. Vi her derfor valgt å sammenligne k-faktor (kondisjonsfaktor = $100 \cdot \text{vekt (gram)} / (\text{lengde})^3 \text{ (cm)}$).

Resultat etter slakting er fra oppgitt av oppdrettsfirmaet, men i noen tilfeller ble ikke samtlige etterspurte data gitt til prosjektgruppen. Resultatet etter slakting for kohortstudien er gitt i tabell 13.

For analysene av data fra *Havbruksdata* har vi hentet ut månedlig informasjon fra alle generasjoner fra og med 2015 (data rapportert inn til Fiskeridirektoratet via Altinn), og satt disse sammen med informasjon fra spørreundersøkelsen. Vi begrenset analysene til produksjonsområde 2, 3 og 4, og inkluderte data fra måned 1 til og med måned 19. Dette innebærer at vi inkluderte informasjon om vekt og fôrforbruk fra mellom 1 og 19 måneder i alle kohorter som ble inkludert i analysene. Kohorter som ikke hadde informasjon fra spørreundersøkelsen eller var registrert som «Ikke undersøkt» ble slettet fra datasettet. Datasettet inkluderte i alt 3365 månedlige observasjoner fordelt på 209 kohorter. Bendelorm ble ikke påvist i 59 kohorter, det var lite bendelorm i 57 av kohortene, middels i 49 kohorter, og mye i 44 kohorter.

Vi har gjort to ulike analyser, én der vi undersøkte tilvekst som en effekt av påvisning av bendelorm, med antall måneder i sjø fram til registrert vekt (eller fôrforbruk), og oppdrettstetthet, og én der vi undersøkte gjennomsnittlig fôrforbruk for hver laks, som en effekt av de samme variablene.

Statistikk

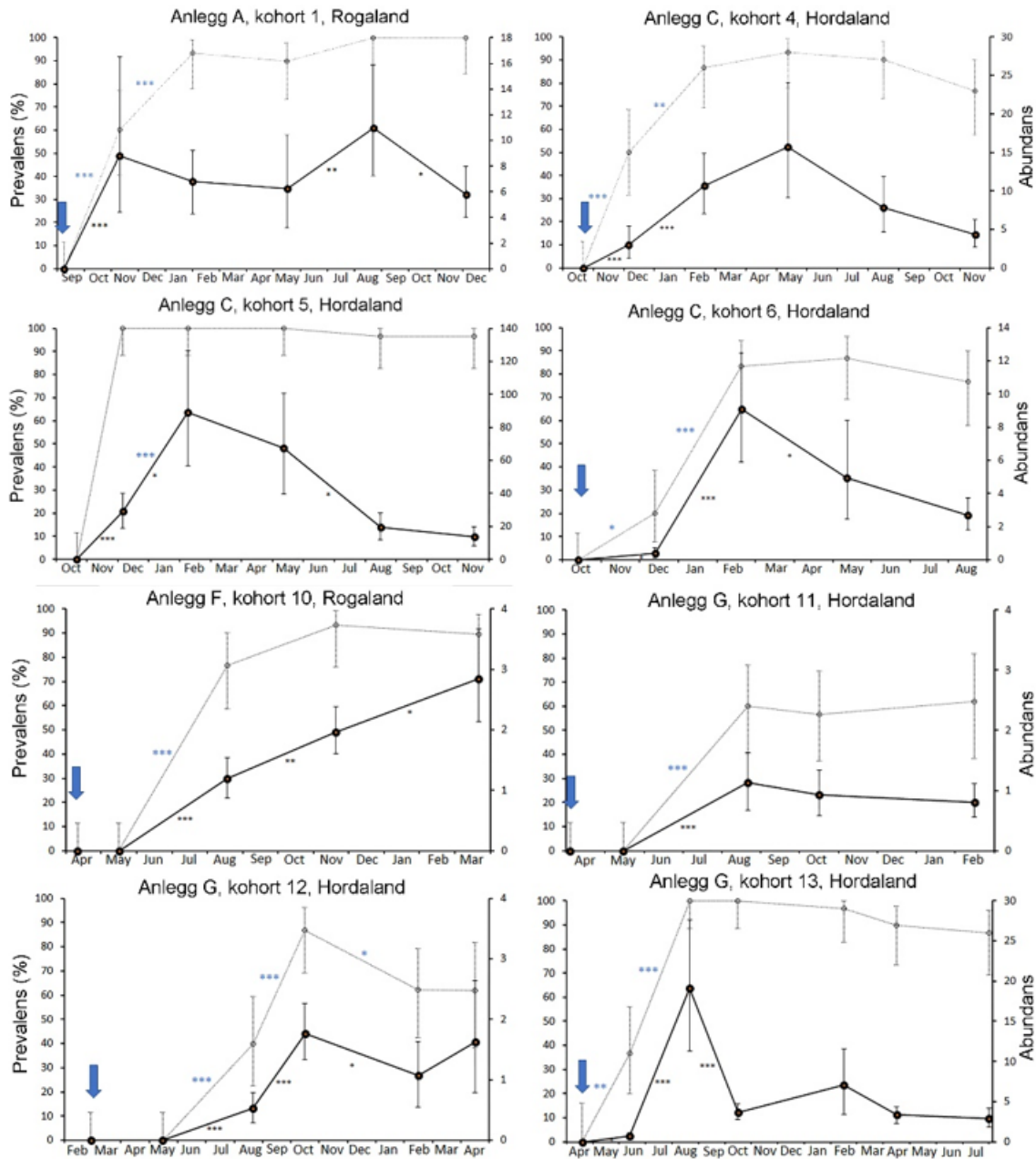
Her undersøkte vi de to responsvariablene vekt og fôrforbruk i to ulike analyser. For å tillate en ikke-lineær utvikling i responsvariablene over tid, så ble disse undersøkt med polynomiale effekter. Vi antok at responsvariablene var normalfordelte etter logtransformasjon, og at det var fornuftig å analysere ved hjelp av vanlige multiple regresjonsanalyser. Alle de tre potensielle variablene (påvisning av bendelorm, antall måneder i sjø og oppdrettstetthet) ble valgt ut ved hjelp av modellseleksjon, med BIC (Bayesian Information Criterion) som informasjonskriterium.

7.3.4 Infeksjonsdynamikk (kohortstudien); resultater og diskusjon

Det ble i utgangspunktet tatt ut over 2200 fiskeprøver i kohortstudien. Av disse ble 1849 prøver analysert. Resultatet er vist i tabell 12. Alle ferskvannsprøver var negative for bendelorm, men kohort 2 ble likevel ekskludert fra datasettet da det ble funnet store individer i noen fisk ved første prøveuttak i sjø (SV 1), noe som indikerte at kohorten likevel kunne ha blitt smittet i ferskvann. Kohortene fra Midt Norge (kohortene 3, 7 og 14) ble funnet å være infisert, men i mindre grad enn forventet. Årsaken til dette er ikke kjent, men det er ikke usannsynlig at det kan skyldes bruk av skjørt, noe som var utbredt i dette området i perioden 2017 - 2019 (Barbo Klakegg, Åkerblå, pers. kommunikasjon). Det er nå vist at skjerming (mot lakselus), også kan ha effekt mot bendelorm (Geitung et al., 2021). Resultatene fra disse kohortene er derfor ikke kommentert videre.

Tabell 12. Tabellen viser oppsummerte resultater fra kohortstudien Gjennomsnittlig antall parasitter pr fisk fordelt på de ulike stadiene som ble funnet fra uttak i sjøvann (SV 1 - SV 6). Prøver fra ferskvann er ikke tatt med da alle var negative. Stadiene er forklart i tabell 11.

		Kohort										
	Stadium	1	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14
SV 1	n plero	0	0	0,43	0,07	0	0	0	0	0	<0,1	0
	n<1	2,9	0	2,4	2,6	0,1	0	0	0	0	0,5	0
	n1-5	4,8	0,7	0,2	16,5	0,2	<0,1	0	0	0	<0,1	0
	n>5	0,7	0	<0,1	9,9	0	<0,1	0	0	0	0	0
SV 2	n plero	0	0	<0,1	0	0	0	0	<0,1	0	<0,1	0
	n<1	0	0	0,1	6,4	0	0	0	0	0	4,9	0
	n1-5	1,0	0	3,8	52,0	2,5	0	0	<0,1	<0,1	5,9	0
	n>5	5,8	0,1	6,87	30,90	6,63	0,30	1,2	1,0	0,5	8,3	<0,1
SV 3	n plero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	n<1	<0,1	0	<0,1	13,7	0	0	0	0	0	<0,1	0
	n1-5	0,8	0	3,8	31,2	0,3	0	0	0	0	0,1	0
	n>5	5,4	0,2	11,9	22,53	4,67	0,07	2,0	0,9	1,8	3,5	0
SV 4	n plero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	n<1	1,1	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	-
	n1-5	0,4	0	4,3	3,2	0	0	0	0	0	0	-
	n>5	9,2	<0,1	3,6	16,1	2,7	0,07	2,8	0,8	1,1	7,0	-
SV 5	n plero	0	-	0	0	-	-	-	-	0	0	-
	n<1	0	-	0	0	-	-	-	-	0	0	-
	n1-5	0	-	0	1,3	-	-	-	-	0	0	-
	n>5	5,8	-	4,3	12,4	-	-	-	-	1,6	3,3	-
SV 6	n plero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
	n<1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
	n1-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-
	n>5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9	-



Figur 14. Infeksjonsdynamikken til *Eubothrium* sp. i kohorter av oppdrettslaks fra Rogaland og Hordaland. Stiplet linje viser prevalens, og solid linje er snitt abundans (begge med konfidensintervaller (95%). Blå piler viser tid for sjøsetting. Stjernene indikerer signifikant endring. Blå stjerner er endring i prevalens, basert på Fisher's eksakt test (FET). Svarte stjerner indikerer endring i abundans, testet med Mann-Whitney tester. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Signifikant økning (stjerner) i prevalens og/eller abundans er bevis for en pågående infeksjon.

Figur 14 viser infeksjonsdynamikken i de fire høst- og fire vårutsett som ble analysert i detalj. Kohort 1, anlegg A: Kohorten ble satt ut i sjøen i september. Prevalens økte fra utsett til 93 % ved prøveuttaket 30. januar (SV 2) deretter var det stabilt fram til slakting. Antall parasitter pr fisk (abundans) økte signifikant fra september til november, og var deretter stabilt frem til andre sommer i sjø, da det også var en økning.

Kohort 4, anlegg C: Kohorten ble satt ut i sjøen i oktober (24.10.17). Det var en signifikant økning i både prevalens og antall parasitter fram til 3 mnd i sjøvann (SV 2: 19.02.18). Det høyeste antall parasitter var ved SV 3 (6 mnd i sjø) for deretter å minske fram til slakting.

Kohort 5, anlegg C: Kohorten ble satt ut i sjø i september 2017¹². Første prøvetaking i sjø (SV 1) var i starten av desember, ca 3 mnd etter utsett. Prevalens var 100% ved SV 1, og holdt seg høy fram til slakting. Denne kohorten hadde høyest gjennomsnittlig antall parasitter ved SV 2, ca 90 parasitter pr fisk. Dette skyldes høy infeksjon, men også det at det ble funnet 423 parasitter i en fisk, og flere med mer enn 200 parasitter i dette prøveuttaket. Senere uttak viser en kraftig reduksjon i antall parasitter. Ved uttak SV 3 i februar ble det funnet 313 juvenile (<1 cm) parasitter i en fisk. Denne fisken var mindre enn de øvrige i uttaket.

Kohort 6, anlegg C: Kohorten ble satt ut i oktober 2018. Prevalens økte høst-vinter til 83 % til februar. Abundans fulgte samme mønster, bikket 8 i snitt i februar og avtok så fram mot slakting.

Kohort 10, anlegg F: Kohorten ble satt ut i sjøen i april, men det ble ikke funnet parasitter ved første uttak i sjø, 15. mai. Deretter var det økning i prevalens og abundans gjennom sommeren. Abundansen var lav, men fortsatte å stige høst -vinter til nesten 3 parasitter pr fisk i mars.

Kohort 11, anlegg G: Kohorten ble satt ut i sjøen april, men det ble ikke registrert infeksjon per 14 mai. Deretter økte prevalens og abundans til august, men var lave (ca. 60%, og i snitt rundt 1 bendelorm). Dette holdt seg stabilt ut forsøksperioden.

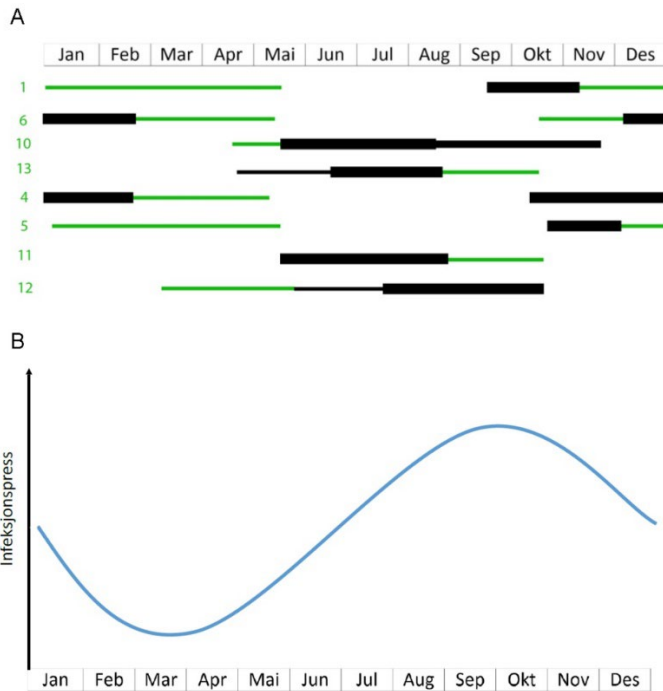
Kohort 12, anlegg G: Kohorten ble satt ut i sjøen mars. Det ble ikke funnet parasitter ved det første sjøuttaket i mai, men i august var prevalens 40% og den økte til 87% ved oktober. Deretter gikk prevalens ned, til 62% i april. Gjennomsnitt antall parasitter (abundans) var lav, ca 1 - 2 pr fisk og fulgte prevalensen.

Kohort 13, anlegg G: Kohorten ble satt ut i sjøen midt i april. I motsetning til de andre kohortene satt ut om våren, ble det funnet noen få parasitter ved første sjøuttak, som her var i juni i stedet for mai. Prevalens og abundans økte kraftig juni til august. Prevalensen var da 100%, og holdt seg høy resten av forsøksperioden. Abundans sank markert august-oktober.

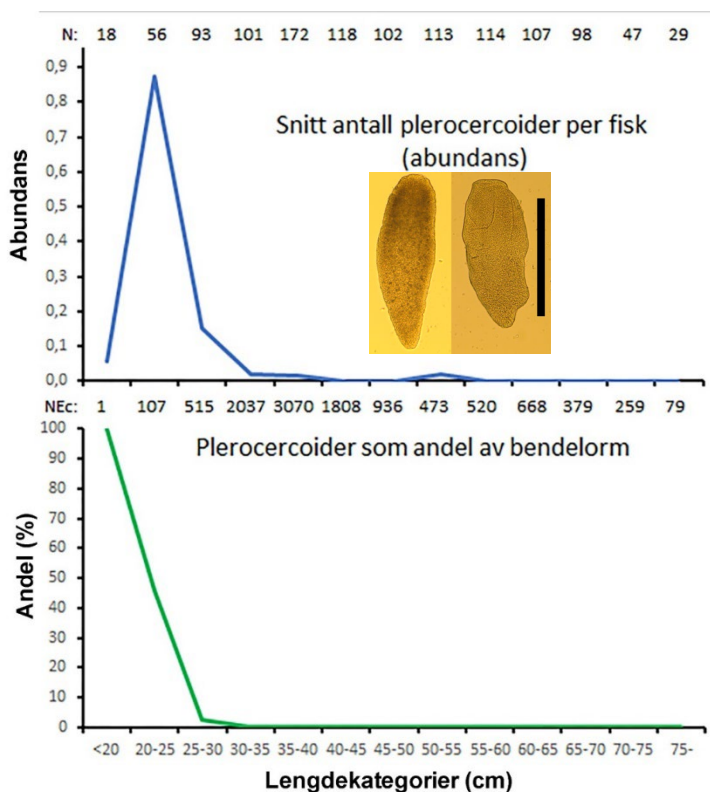
Generelt

I de områdene som omfattes av kohortstudien ser det ut til at fisken som settes ut i sjøen om høsten blir raskere infisert sammenlignet med den fisken som settes ut om våren. Statistisk signifikant økning i prevalens eller abundans (vist med stjerne i Figur 14) viser at det skjer infeksjon i perioden. Fisken utsettes altså for infeksjon ved at den spiser kopepoder infisert med procercoider som driver inn i merdene. For å få et generelt bilde av smittedynamikken, satte vi opp en tidsakse der alle de åtte kohortenes signifikante prevalens eller økninger i abundans er markert Figur 15 A). Hovedmønsteret som kan tolkes fra dette er også antydnet i Figur 15 B).

¹² Ferskvannsprøven ble tatt av gjenværende fisk i anlegget i oktober, etter at kohort 5 ble satt ut i sjøen. Da kohorten ble satt ut i september er pil for utsettingstidspunkt ikke tegnet inn.



Figur 15. Oversikt over alle de studerte vår og høstutsatte laksekohortene. Perioder med signifikant økning i prevalens eller abundans er markert i sort, ingen endring er markert som grønt. I tillegg angir tykkelsen av linjen grad av signifikans (tynn sort $P < 0,05$, medium $P < 0,01$, tykk $P < 0,001$). Infeksjonspresset gjennom året som kan tolkes ut fra disse vurderingene er visualisert i B.



Figur 16. Forekomst av svært små bendelormlarver uten ledd (plerocercoider, innsatt bilde) i oppdrettslaksen i forhold til fiskens lengde. En har gjennomsnittlig flest plerocercoider i fisk som er mindre enn 30 cm lange. N, antall fisk i kategori; NEc, antall *Eubothrium* sp. i kategori. Målestokken i bildet av plerocercoiden er 0.5 mm lang, og er representativ for begge bildene. Bildene er tatt av Marte Andrea Fjær.

Årstid

For å kunne infisere den utvandrende smolten av vill Atlantisk laks, bør kopepoder som inneholder infektive larver være til stede mai-juni da smolten vandrer fra elva til havet (Ugedal et al., 2014). Laksesmolt migrerer raskt fra kystområdene, og ytterligere infeksjoner i åpent hav virker usannsynlig, fordi de kjente sannsynlige mellomvertene, *Acartia clausi* og *Temora longicornis* (Hodneland and Solberg, 1995) er mest vanlige i kystområdene (Gundersen, 1953; Matthews, 1967). *Acartia* spp. kan toppe i juli og september, og har en tendens til å forekomme i de øvre vannmassene. *Temora longicornis* virker mer sporadisk, men med økt i forekomst vår - sommer (Gundersen, 1953; Matthews, 1967).

Utviklingsstadier funnet i fisken indikerer en begrenset infeksjonsperiode, ved at de fleste individene var i samme utviklingsstadium og størrelse. Det ble generelt færre av de foregående stadiene ettersom fisken vokste, noe som indikerer at det ikke nye var kontinuerlig infeksjon. Fisken ble infisert i en avgrenset periode, fordi det ble færre tidlige stadier etter hvert. Det var variasjon av hvilke stadier/ størrelser av parasitten som var tilstede. Dette stemmer med Saksvik et al. (2001b) som viste ved eksperimentell smitte via *Acartia tonsa* at en kunne ha små stadier flere (11) måneder etter smitte.

Det er rapportert at cestoder kan overleve i fiskens tarm i to år, muligens enda lenger (Fahy, 1980). Det betyr at bendelorm som finnes i fisken ved slakting, kan ha infisert i fisken på et tidlig stadium. I naturen vil laks også kunne bli smittet gjennom å spise en annen fisk som har frie plerocercoidlarver i tarmen (transportverter). Juvenile *Eubothrium crassum* er påvist både i sild, pukkellaks, sil og ål (Fjær, 2019; Haugslund, 2020 og Karlsbakk upubliserte data). Dette er lite sannsynlig i oppdrett, fordi fisken kun sjeldent vil kunne spise små planktonspisende villfisk.

Fiskestørrelse

Figur 16 viser forekomst av plerocercoider i kategorier sett i forhold til fiskestørrelse. Plerocercoider nesten utelukkende funnet i små laks under 30 cm. Det er derfor sannsynlig at fisken særlig spiser de små kopepodene som har larvene i seg de første ukene etter sjøoverføring. Fisken spiser sannsynligvis mindre og mindre zooplankton etter som den tilvennes fôr og blir større, men det synes ikke å være gjort undersøkelser på dette fenomenet. Fisk som spiser zooplankton som kopepoder gjør dette ved å sile vannet gjennom gjellegitterstavene. Etter som fisken vokser vil avstanden mellom gjellegitterstavene øke; noe som reduserer evnen til å filtrere og spise små byttedyr som kopepoder. Antallet parasitter var også generelt negativt korrelert med lengden på fisken i tidlige uttak i sjø (SV 1 - SV 3). Dette kan også ha sammenheng med at særlig liten fisk blir infisert. Disse taper gjerne i konkurransen om fôr og beiter mer på dyreplankton, men infeksjonen vil også etter hvert påvirke veksten (Saksvik et al., 2001a).

Kohort 5 og kohort 13 er mindre enn fisken i de fleste andre kohortene ved utsett, henholdsvis 19.6 og 19.3 cm (Tabell 13). Kohort 13 ble satt ut om våren. Denne kohorten ble raskt infisert og fikk en prevalens på 100 % etter 3 mnd i sjøen. Gjennomsnittlig antall parasitter var 20 ved SV 2. Kohort 5 som ble satt ut om høsten fikk det høyeste antallet parasitter og hadde prevalens på 100 % ved første uttak i sjø. Dersom vi velger å se bort fra andre variabler, så ser det ut til at størrelse ved utsett er av avgjørende betydning.

Infeksjonsdynamikk, oppsummering

Både fisk som ble satt ut i sjøen om våren og om høsten ble infisert med bendelorm. Infeksjon ser ut til å skje i mai til februar med høyest smittepress på høsten (august - desember). Grad av infeksjon var også avhengig av fiskestørrelse. Det ble nesten ikke påvist plerocercoider i fisk over 30 cm, og det ble funnet svært få i kategorien juvenil 1 (<1 cm) (Tabell 12) i fisk større enn 40 cm.

Forebygging og behandling

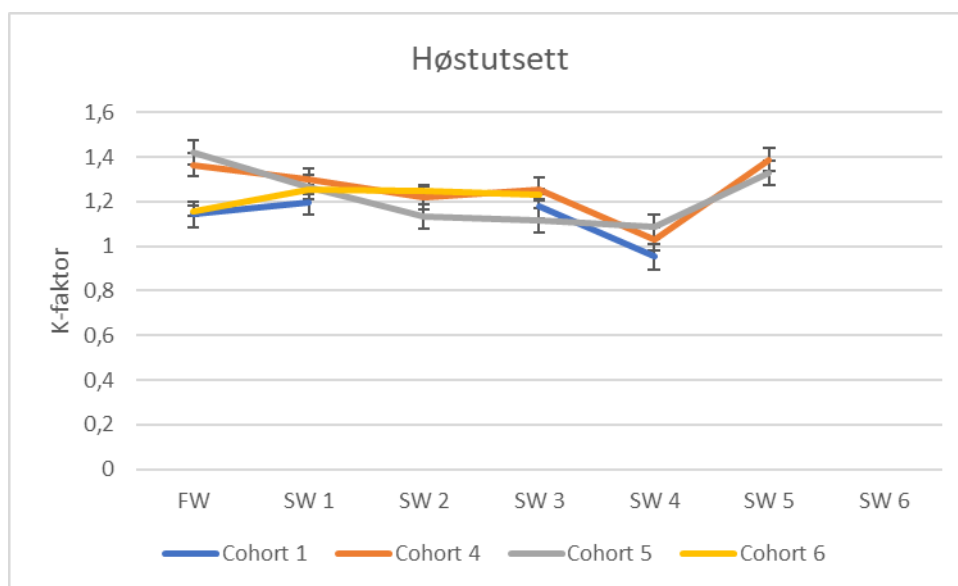
Observasjonene i denne studien tyder på at profylaktiske tiltak effektivt kan beskytte mot infeksjon med bendelorm etter utsett i sjø. Mindre fisk har høyere risiko for å bli smittet av *Eubothrium crassum* enn større. Mindre fisk er mere motivert til å spise små byttedyr (zooplankton-copepoder), og er bedre utstyrt til dette (finere gjellegitter). Rett etter utsett kan det være en utfordring å få fisken til å ta til seg fôr på grunn av nytt miljø; overgang til sjø. Dette kan medføre at fisken spiser mer plankton. Den er også i riktig størrelse til det. Infeksjon av liten fisk kan hindres ved skjerming (Geitung et al., 2021), og det passer godt med at de kjente plankton-copepod mellomverte er særlig knyttet til overflatevann (Gundersen, 1953; Matthews, 1967). Alternativt kan fisken settes ut i sjøen i tider på året når infeksjoner er fraværende eller lave, som om vinteren når mellomverte (copepodene) er fåtallige. Fisken kan da vokse til en størrelse da de i liten grad spiser copepoder og blir derfor lite infisert, før smittepresset stiger (august). Observasjonene her tyder på at behandling kan utføres når fisken er over 30 cm lang, ettersom den da i ubetydelig grad vil bli smittet på nytt.

7.3.5 Produksjonsdata fra kohortene, resultater og diskusjon

Det ble målt lengde og vekt på fisken ved hvert prøveuttak i kohortstudien (beskrevet i 7.3.3.2). Kohortene i Midt Norge ble som tidligere nevnt i liten grad infisert og resultatet er ikke tatt med i i tabell 13. Kohort 2 ble også ekskludert etter funn av store parasitter i SV 1. Tabell 13 viser vekten på fisken gjennom forsøksperioden for kohortstudien. Etter veiing av kohort 1 ved SV 2 ble det oppdaget feil på vekten som ble benyttet. Disse resultatene er feil og er derfor tatt ut. Påvirkning på vekst ble også vurdert av Ruud 2019 og Sakariassen 2019, men de resultatene som er understreket i tabellen ble ikke omtalt, fordi de ble analysert på et senere tidspunkt. Prøveuttak SV 4 for kohort 11 og 12; SV 5 for kohort 1, 6, 10, 12 og 13; Sv 6 for kohort 13.

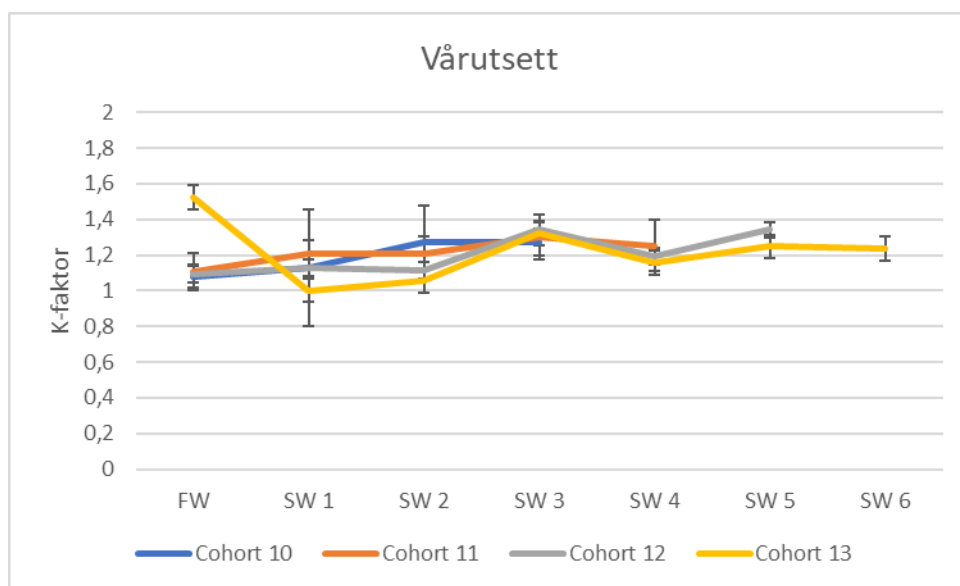
Tabell 13. Gjennomsnittsvekt med standard avvik (SD) for de forskjellige kohorter. Merk at tiden mellom prøveuttakene varierer noe for hver kohort.

Lokalitet	Kohort ³	Utsett sjø	Ferskv.	SV 1	SV 2	SV 3	SV 4	SV 5	SV 6
A	1	Høst	156(24)	331 (190)	-	1445 (540)	2215 (901)	<u>5770 (1494)</u>	
C	4	Høst	112 (112)	330(93)	568 (170)	932 (242)	1701 (607)	3536 (1068)	
C	5	Høst	107(17)	601 (129)	691 (192)	1094 (464)	2238 (688)	3708 (1553)	
C	6	Høst	159(26)	286 (58)	601 (110)	939 (233)	-	<u>5770 (1494)</u>	
F	10	Vår	181 (32)	420 (74)	1562 (282)	3236 (464)	4649 (1034)	<u>3536 (1068)</u>	
G	11	Vår	309 (94)	470(119)	1763(346)	2566(559)	3997(1132)	-	
G	12	Vår	184 (37)	518 (126)	1253(185)	2080(439)	<u>3065(757)</u>	<u>4420(1760)</u>	
G	13	Vår	109 (15)	192 (67)	597(224)	1412(234)	2138(699)	<u>3223(1154)</u>	<u>4626(1226)</u>



Figur 17. Kondisjonsfaktor ($K\text{-faktor} = 100 * (\text{vekt} / (\text{lengde})^3)$) for kohort satt ut i sjøen høsten 2017, kohort 1, 4, 5 og 6. Kohort 6 var på en lokalitet C, der det ble påvist PD i mars 2018, dvs i perioden mellom SV 2 - SV 3. Kohort 6 ble slaktet ut kort tid etterpå. Feilfelt er SD.

Kohort 5 er tyngst infisert (høyest abundans) og har lavest K-faktor i perioden SV 2 - SV 3



Figur 18. Kondisjonsfaktor ($K\text{-faktor} = 100 * (\text{vekt} / (\text{lengde})^3)$) for kohort satt ut i sjøen våren 2018, kohort 10, 11, 12 og 13. Feilfelt er SD.

Kohort 13 blir infisert med bendelorm rett etter utsett (SV 1) (Figur 18). K-faktor for samme kohort reduseres etter utsett. Det er i samme periode som kohorten får infeksjon med bendelorm.

Korrelasjonen mellom og fiskens størrelse ble undersøkt av Ruud (2019) og Sakariassen (2019). Negative korrelasjoner viser da at f.eks. lav vekt har en tendens til å ha flere parasitter; positiv korrelasjon viser at det er mindre parasitter i større fisk. Begge forfatterne undersøkte kohortene i denne rapporten og fant generelt en negativ korrelasjon med fiskens lengde. Det var variasjon i korrelasjon mellom vekt og abundans, men det fikk mindre betydning utover i produksjonen.

Ruud (2019) undersøkte også forholdet mellom vertens k-faktor og grad av infeksjon for kohortene 1, 6, 10 og 13. Det var en svak negativ ikke-signifikant korrelasjon i de fleste tilfellene, men signifikant når det var høy abundans. Dette kan indikere at *Eubothrium* sp. infeksjon kan ha negativ innvirkning på vekst selv om fôrtilgangen er stor. Dette er en feltstudie og det er derfor mange forhold som kan påvirke fiskens vekst. Det er sannsynlig at fisken kan maskere effekten av *Eubothrium* ved å spise mer. Dette vil i så fall påvirke fôrfaktoren (forholdet mellom antall kilo forbrukt fôr og antall kilo tilvekst på fisken). Det er også mulig at de minste fiskene spiser mere zooplankton, og får en høyere abundans (kohort 1).

For kohortene 1, 6, 10 og 13 ble parasittene også veid. Vekten (biomasse) vil gi en mer reell verdi for belastning enn antall, siden parasittene kan variere fra 0,5 mm til 1470 mm i lengde og fra nesten 0 til >7 g vekt (E. Karlsbakk, pers. obs.). Dette er vurdert ut fra at parasittene tar opp næring fra det som fisken spiser. Næringsopptaket til parasitten er det som eventuelt kan måles i form av tap av vekst, deformiteter pga manglende mikroelementer etc. Det fysiske ubehaget fisken eventuelt måtte ha er ikke mulig å estimere. Det ble imidlertid ikke funnet noen signifikant korrelasjon med K-faktor og parasittvekt.

Tabell 14. Beskrivelse av produksjonsdata for kohorter i kohortstudien. Alle data var ikke tilgjengelig for alle kohorter. Biologisk fôrfaktor: Forholdet mellom antall kilo forbrukt fôr og antall kilo tilvekst på fisken. Økonomiske fôrfaktor: Tar også hensyn dødelighet under produksjonen.

Lokalitet	Kohort	Utsett sjø	Økonomisk fôrfaktor	Biologisk fôrfaktor	Slakt Prod	Ordinær	Superior	Vrak
A	1	Høst	1.26	1.21	2.1	4.9	91.7	1.3
C	4	Høst	1.43	1.25	3.1	0	90.9	6
C	5	Høst	1.57	1.44	1.4	3.2	90.4	5
C	6	Høst	1.36	1.26	2.5	0	94.8	1.8
F	10	Vår	1.13	1.22	3.2	4.3	92.2	0.2
G	11	Vår	1.31	1.22	-	-	89	-
G	12	Vår	1.91	1.07	-	-	81	-
G	13	Vår	1.78	1.23	-	-	92	-

Det er mange faktorer som spiller inn på fiskens helse, slakteresultat og fôrfaktor; andre sykdommer, og behandlinger, eks lakselus. Det er derfor vanskelig å si med sikkerhet hvilken betydning infeksjon med bendelorm har for fiskehelsen når det er ubegrenset fôrtilgang.

7.3.6 Påvirkning på vekst og fôrforbruk, resultater og diskusjon

Påvisning av bendelorm og effekter på vekst

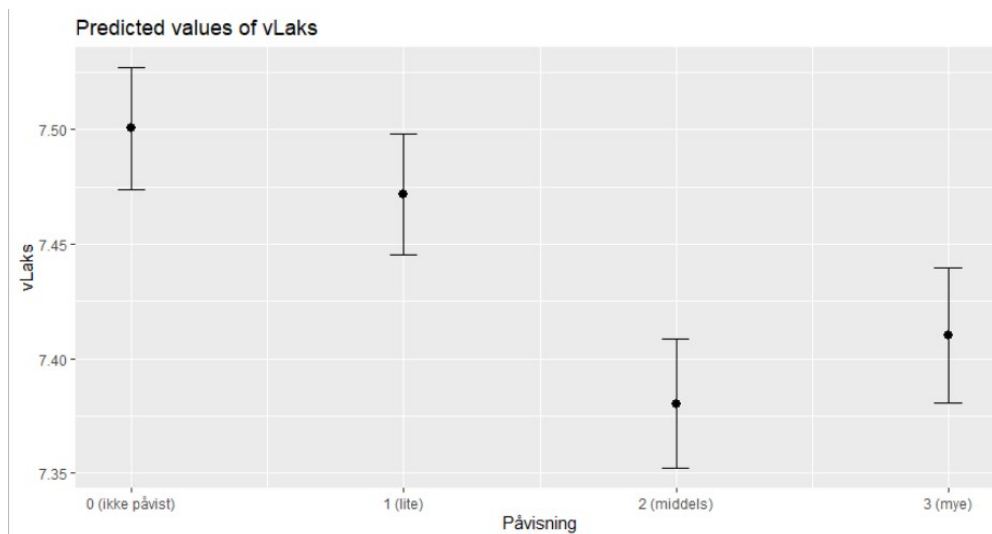
Den beste modellen for å forklare vekst gjennom produksjonsforløpet forklarte gjennomsnittsvekst på laks som en effekt av antall måneder i sjø (som tredjegrads polynom), og påvisning (fem kategorier, som beskrevet under metode). Oppdrettstetthet ga ikke signifikant effekt. Modellen tar formen (formel 1).

$$vekt = e^{\beta_1 mnd \text{ i sjø} + \beta_2 (mnd \text{ i sjø})^2 + 3(mnd \text{ i sjø})^3 + \text{Påvisning} + \epsilon}$$

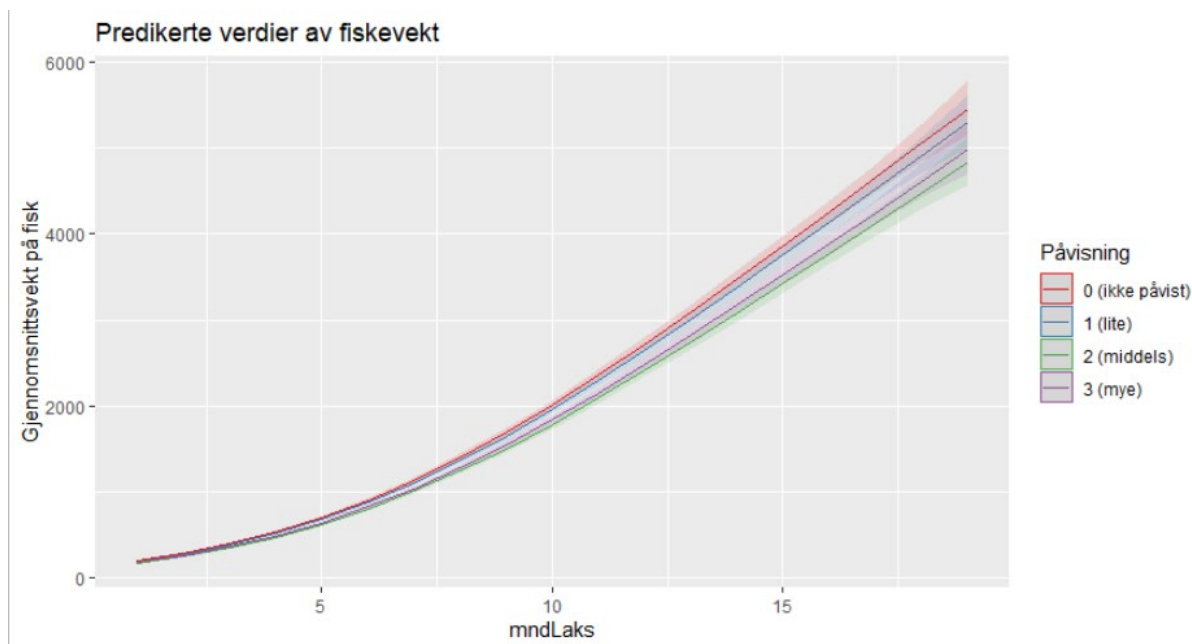
der β_{1-3} er effektstørrelsen av de ulike parameterne, «Påvisning» kan ta verdiene som indikeres i «estimat» under «Påvisning» i modelltabellen (Tabell 15) og ϵ er usikkerhetsleddet som er normalfordelt rundt estimatet. Forskjellen mellom de forskjellige kategoriene under «Påvisning» vises i Figur 19, og illustrerer tilvekst over tid for de ulike kategoriene under «Påvisning» (se 7.1.3.1).

Tabell 15. Modellparametere fra den beste modellen som beskriver vekt som en effekt av påvisning og relevante kovariater.

Koeffisient	Estimat	Standard feil	p
<i>Kontinuerlige variable</i>			
Mnd i sjø	53,5	0,36	< 0.001
(Mnd i sjø) ²	-11,7	0,36	< 0.001
(Mnd i sjø) ³	1,58	0,36	< 0.001
<i>Påvisning (faktor)</i>			
Ikke påvist	7,29	0,012	< 0.001
Lite	7,26	0,012	< 0.001
Middels	7,17	0,013	< 0.001
Mye	7,19	0,014	< 0.001



Figur 19. Predikert forskjell i vekt mellom de ulike kategoriene under «Påvisning» hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.



Figur 20. Prediksjon av tilvekst over tid for alle kategorier som inngår i variabelen «Påvisning», hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.

En Tukey HSD test for multiple sammenligninger av kategoriene under påvisning viser at kategoriene under «Påvisning» danner to distinkte kategorier. Kategoriene «ikke påvist» og «lite» er ikke signifikant forskjellige fra hverandre, men gir signifikant bedre tilvekst enn kategoriene «middels» og «mye». «Middels» og «mye» er ikke signifikant forskjellige fra hverandre.

Påvisning av bendelorm og effekter på fôrforbruk

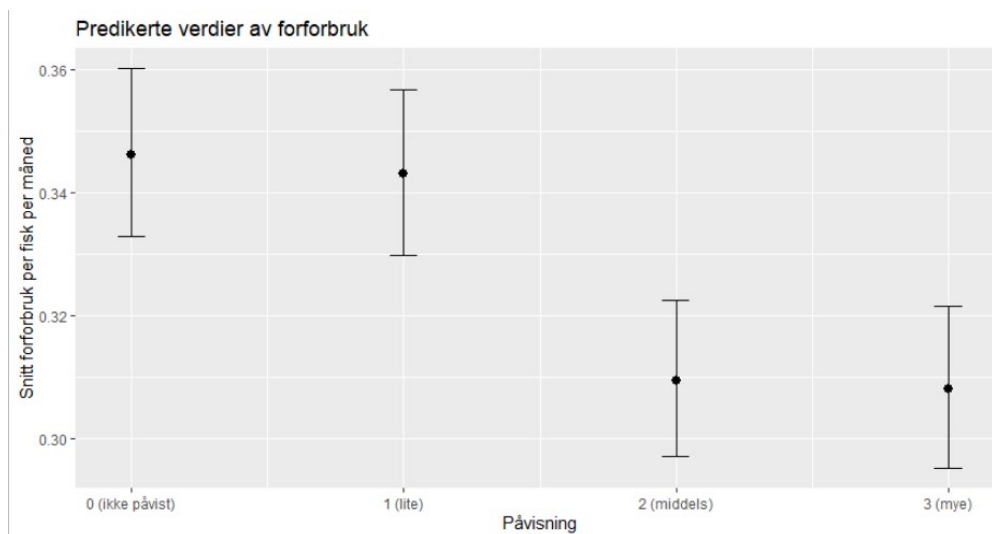
Den beste modellen for å forklare fôrforbruk gjennom produksjonsforløpet forklarte gjennomsnittsvest på laks som en effekt av oppdrettstetthet (logtransformert), antall måneder i sjø (som tredjegrads polynom), og påvisning (fem kategorier, som beskrevet under metode). Modellen tar formen (formel 1).

$$\text{fôrforbruk} = e^{\beta_1 \log(\text{oppdrettstetthet}) + \beta_2 \text{mnd i sjø} + \beta_3 (\text{mnd i sjø})^2 + \beta_4 (\text{mnd i sjø})^3 + \text{Påvisning} + \varepsilon}$$

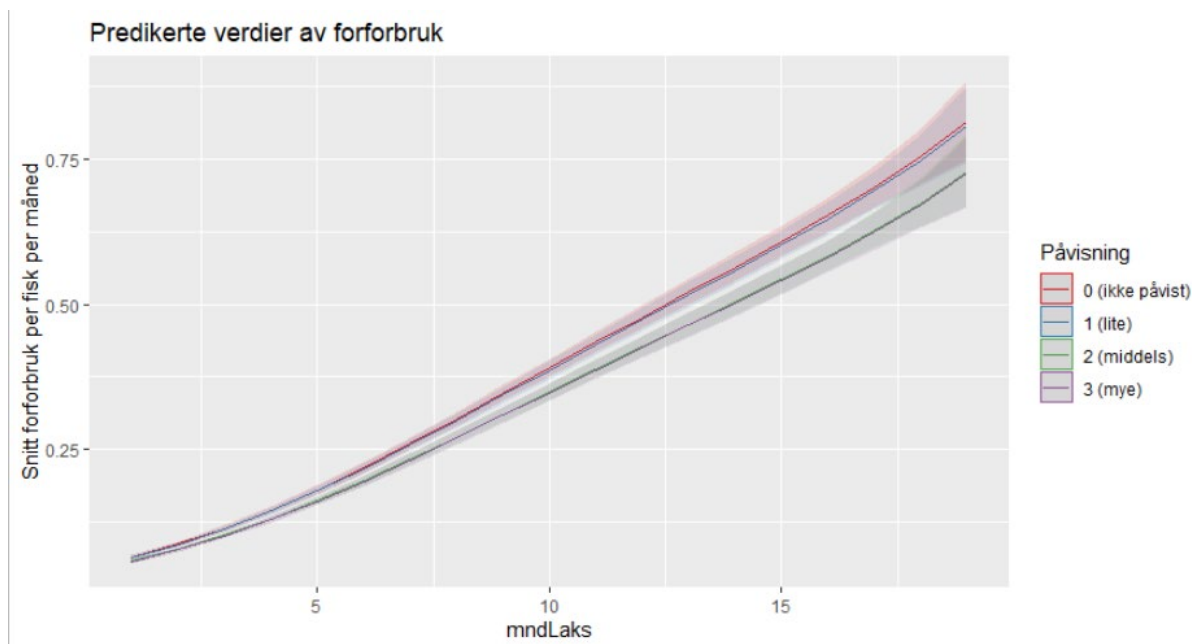
der β_{1-4} er effektstørrelsen av de ulike parameterne, «Påvisning» kan ta verdiene som indikeres i «estimat» under «Påvisning» i modelltabellen (Tabell 2) og ε er usikkerhetsleddet som er normalfordelt rundt estimatet. Forskjellen mellom de forskjellige kategoriene under «Påvisning» vises i Figur 21, og Figur 22 illustrerer fôrforbruk over tid for de ulike kategoriene under «Påvisning».

Tabell 16. modellparametere fra den beste modellen som beskriver fôrforbruk som en effekt av påvisning og relevante co-varianter.

Koeffisient	Estimat	Standard feil	p
Kontinuerlige variable			
log(Oppdrettstetthet)	0,080	0,016	
Mnd i sjø	39,9	0,52	< 0.001
(Mnd i sjø) ²	-9,8	0,52	< 0.001
(Mnd i sjø) ³	2,4	0,52	< 0.001
Påvisning (faktor)			
Ikke påvist	-2,8	0,31	< 0.001
Lite	-2,8	0,31	< 0.001
Middels	-2,9	0,31	< 0.001
Mye	-2,9	0,31	< 0.001



Figur 21. Predikert forskjell i gjennomsnittlig fôrforbruk mellom de ulike kategoriene under «Påvisning» hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet



Figur 22. Prediksjon av gjennomsnittlig fôrforbruk over tid for alle kategorier som inngår i variabelen «Påvisning» hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.

En Tukey HSD test for multiple sammenligninger av kategoriene under påvisning viser at kategoriene under «Påvisning» danner to distinkte kategorier. Kategoriene «ikke påvist» og «lite» er signifikant forskjellige fra hverandre, men begge gir signifikant lavere forforbruk enn kategoriene «middels» og «mye». «Middels» og «mye» er ikke signifikant forskjellige fra hverandre.

Oppsummering

Evaluerings av *Eubothrium crassum* påvirkning på tilvekst og forforbruk med statistiske metoder av resultatene fra spørreundersøkelsen og *Havbruksdata* viser følgende:

- Fisk uten eller med få bendelorm har ikke signifikant forskjellig tilvekst. Fisk med middels eller mye bendelorm har signifikant dårligere tilvekst, men disse kategoriene ikke signifikant forskjellige fra hverandre.
- Fisk uten eller med få bendelorm har lavere fôrforbruk enn fisk med middels eller mye bendelorm.

Det virker altså som at fisken kan kompensere for de negative effektene bendelormen har ved å spise mere fôr, men dette bør undersøkes nærmere eksperimentelt.

7.4 Del 4: Behandlingsprosedyrer

Ansvarlig for aktivitet: Sigmund Sevatdal

Bidragstere: Egil Karlsbakk, Haakon Hansen

7.4.1 Introduksjon

Når populasjoner av oppdrettsfisk (eller andre husdyr) er infisert parasitter kan det være aktuelt å behandle av etiske årsaker dersom infeksjonen kan medføre redusert helsetilstand med ubehag og smerte, redusert livskvalitet, generell immunsvekkelse. I tillegg er det aktuelt å behandle av rene økonomiske årsaker som å unngå tap for oppdretter (tap av tilvekst eller økt fôrforbruk), eller av epidemiologiske årsaker (redusere smittespredning). For en oppdretter kan infeksjoner med *Eubothrium* sp. ha negative effekter ved å redusere tilveksten til laksen, eller ved å øke kostnadene (Berland and Bristow, 1990; Bristow and Berland, 1991; Saksvik et al., 2001a) Det har derfor blitt behandlet med anthelmintica i fôret som dreper parasitten. Både praziquantel (Droncit vet., Bayer) og fenbendazol (Panacur, MSD) har vært brukt til behandling av laksefisk. Det er imidlertid flere aspekter som må vurderes før en behandling iverksettes. Resistens hos bendelorm er et problem (Sevatdal, 2008). Det er mulig å teste om det er resistens mot praziquantel før behandling med en *in vitro* test (bioassay). Protokoll for dette er publisert (Sevatdal, 2014). Behandlinger kan også indukere negative bivirkninger hos fisken, som mangel på matlyst og redusert vekst. Medisinsk aktive substanser er generelt toksiske og vil være negative for miljøet, selv om miljøeffekter av praziquantel er vurdert å være lave (Hektoen, 1995). Det er derfor viktig å behandle lite, men så effektivt som mulig når det først behandles.

Som nevnt i kapittel 7.2.1 blir behandlingseffekten ved en behandling mot bendelorm evaluert basert på tilstedeværelse eller intensitet av infeksjon etter at behandlingen er gjennomført. Dette medfører en stor usikkerhet, da en behandling vil kunne gi f.eks. 90 % reduksjon i antall parasitter, men ikke fjerne alle parasittene. I et slikt tilfelle vil en undersøkelse av tilstedeværelse i etterkant av behandlingen bli registrert som ingen effekt, da det fortsatt er parasitter tilstede. Det vil altså kunne være en stor effekt ved at antallet parasitter ville gå betydelig ned, men i og med at antallet parasitter før behandling ikke var kjent så vil dette ikke registreres som effekt hvis det er minimum én parasitt igjen. Overlevende parasitter etter en behandling kan også få bedre forhold fordi konkurransen blir mindre og tilgangen på næring bedre, noe som kan føre til bedre vekst for de overlevende parasitter.

7.4.2 Problemstilling

Målet for denne delen av prosjektet var å få mer kunnskap om beste praksis for behandling av bendelorminfeksjoner i oppdrettsfisk, herunder hvilket tidspunkt det er best å behandle på, hvilke doser av praziquantel som er optimale og hvordan behandlinger best evalueres. Sammen med resultater fra de andre delene av prosjektet skulle det utarbeides en prosedyre for beste praksis for behandlinger mot bendelorm.

7.4.3 Materiale og metode, del 4.

For å svare på problemstillingen i denne delen var det planlagt å gjennomføre et medisineringsforsøk med praziquantel. Praziquantel er ikke godkjent for atlantisk laks, men benyttes iht kaskadeprinsippet og kan benyttes dersom søknad om godkjenningsfritak godkjennes. Dosen på 10 mg/ kg er anbefalt ut fra bruk på andre matproduserende dyr. For storfe og sau er anbefalt dose for bendelorm generelt 10 mg/ kg (Parasitipedia.net). Det er ikke undersøkt om denne dosen gir optimal effekt mot *Eubothrium* sp. på laks. Enkelte fisk er tungt infisert og parasittene kan utgjøre en betydelig andel av biomassen (26 g bendelorm, 1% fiskevekten (resultat fra kohortstudien). Dette er betydelig større del av biomassen sammenlignet med andre dyr eksempelvis storfe og sau.

Det var planlagt en dose -responsstudie for å undersøke om hvilken dose av praziquantel som ga best resultat. Studien skulle gjennomføres i samarbeid med de industrielle partnerne i prosjektet; MOWI og Lerøy. Det ble dessverre ikke mulig å gjennomføre studien fordi ingen av partnerne kunne stille anlegg til rådighet for forsøket; dette pga koronarestriksjoner som medførte besøksforbud på anleggene. Se også mer detaljert forklaring på avvik i 8).

7.4.4 Resultater og diskusjon

Da de forsøkene som var planlagt i denne delen av prosjektet ikke kunne gjennomføres, har vi i stedet forsøkt å sammenstille det vi har av kunnskap fra de andre delene prosjektet, først og fremst fra kohortstudien, og fra andre studier, til i en beste praksis for behandling og evaluering av behandlinger mot bendelorm i oppdrettslaks.

Behandlingsregime i forhold til infeksjonsdynamikk og livssyklus.

Resultatene fra kohortstudien viser at både utsettene om høsten og om våren blir infisert, men at høstutsettene blir infisert raskere og med flere parasitter (høyere abundans). Infeksjonspresset er høyest sensommer og høst. Resultatene viser også at smittepresset er lavt vinter-vår. Den største risikofaktoren mhp infeksjon er imidlertid størrelsen på fisken. Liten fisk blir infisert raskere og tyngre enn større fisk. Fisk større enn 30 cm blir i liten grad infisert, heller ikke re-infisert etter behandling (egne observasjoner). Risikoen for infeksjon er større dess mindre fisken er både mhp prevalens og antall parasitter. Små fisk bør derfor skjermes av fysiske barrierer som eksempelvis skjørt eller snorkel den første tiden i sjøen.

Beste praksis og forslag til prosedyrer for behandling og evaluering mot bendelorm, *Eubothrium crassum*

Preventive strategier

- Størrelse på fisk ved utsett
 - Sett ut så stor fisk som mulig, helst over 30 cm
- Årstid
 - Sett fisken ut i sjøen vinter - tidlig vår, slik at den er så stor som mulig når infeksjonspresset øker utover sommer - høst
- Skjerming
 - Fisken skjermes først og fremst for å hindre infeksjon med lakselus, men det er sannsynlig at skjerming er også effektivt mot bendelorm.
 - Dersom det settes ut liten fisk bør denne skjermes med skjørt, eller i semilukket eller lukket anlegg. Anlegget kan åpnes eller fisken kan flyttes når fisken når en størrelse over 30 cm.
- Sjekke infeksjon
 - Sjekke jevnlig om fisken blir infisert med bendelorm. Dette kan gjøres med svabermetoden som er utviklet i dette prosjektet. Infeksjon kan da sjekkes parallelt med undersøkelse av lakselus, uten at fisken trenger å avlives.

Beste praksis for å unngå infeksjon av bendelorm, vil være å sette ut så stor fisk som mulig når det er lavt smittepress om vinteren eller tidlig vår. Alternativt sette ut fisk med skjerming om vinteren eller tidlig vår.

Strategier ved behandling

- Evaluere nødvendigheten av behandling og muligheten for behandling
 - Det beste er å undersøke antall parasitter pr fisk (abundans) før behandling.
 - Alternativt kan det undersøkes prevalens, enten med obduksjon eller på et større antall fisk med svabermetoden som er utviklet i dette prosjektet.
 - Undersøke resistens med bioassay (*in vitro* test) før det planlegges å behandle (<https://www.fhf.no/prosjekter/prosjektbasen/900988/>)
- Behandle på riktig tidspunkt mhp fiskestørrelse. Behandle så tidlig som mulig for å bruke minst mulig medisinfôr, men først når fisken er så stor at muligheten for reinfeksjon er liten, dvs når fisken er over 30 cm.
- Behandle når fisken har god appetitt
- Behandle med riktig dose (anbefalt dose er 10 mg/ kg, fordelt over 2 dager, dvs 5 mg/ kg pr dag).

Evaluering av effekt

- Evaluere effekt av behandling på minimum 30 fisk pr merd 2 - 3 uker etter behandling
- Best evaluering med å undersøke abundans før og etter behandling. Denne metoden er tidkrevende.
- Alternativt kan effekt som prevalens evalueres på et større antall fisk (30 - 50) pr merd etter behandling.
 - Svabermetoden som er utviklet i prosjektet kan benyttes til dette.

8 Avvik fra opprinnelig prosjektplan

Som mange andre deler av samfunnet har også dette prosjektet blitt påvirket av koronaepidemien. Dette har ført til både endringer underveis og store forsinkelser i flere av leveransene. Dette er beklagelig, men totalt sett har vi oppnådd mange og gode resultater innenfor prosjektet likevel. Avvik er også nevnt i noen grad i teksten tidligere, men vi oppsummerer de viktigste her og beskriver dem i mer detalj.

Del 1: I del 1 var det meningen å studere utbredelsen av resistens i forskjellige populasjoner ved bruk av publiserte bioassay (Sevatdal, 2014), men dette ble ikke gjennomført blant annet pga koronarestriksjoner på besøk på anlegg. Det gjort forsøk på å innhente informasjon om resistens via spørreskjemaet, men resultatene som kom inn var for mangelfulle til å gi god informasjon.

Del 2: Det var i planen for del 2 at også infeksjoner i regnbueørret skulle studeres for å se om denne verten kunne være infisert av både *Eubothrium crassum* og *E. salvelini*, slik det har vært rapportert fra andre steder. Dette ble imidlertid ikke gjennomført da vi ikke fikk tak i noen prøver. Vi mottok en prøve av en bendelorm fra regnbueørret til genomsekvensering og denne ble bestemt til *E. crassum*.

Del 3: I del 3 skulle vi blant annet bruke historiske produksjonsdata fra Mowi AS og Lerøy AS til å se på påvirkning på vekst og helse, men dette ble mindre omfattende enn planlagt da vi ikke mottok alle ønskede data. Fra prosjektets side har vi gjort det vi kunne for å kunne få tilgang til de produksjonsdata vi mente var nødvendige for å gjennomføre analysene.

Del 4: Del 4 var i hovedsak planlagt gjennomført som et medisineringsforsøk for å undersøke dose-respons ved forskjellige doser av Praziquantel. Studien, med tittelen «*Testing regimes with praziquantel for treatment of Atlantic salmon against tapeworm Eubothrium sp.*», skulle gjennomføres i samarbeid med MOWI og Lerøy. Det ble skrevet en protokoll for studien og søknad ble sendt til FOTS (FOTS ID 21277) om bruk av forsøksdyr. Søknaden ble innvilget, men det ble likevel dessverre ikke mulig å gjennomføre studien fordi ingen av partnerne kunne stille anlegg til rådighet for forsøket. Dette skyldtes både koronarestriksjoner når det gjaldt besøk på anleggene av andre enn ansatte og i tillegg at det aktuelle anlegget mente rømningsfaren i forbindelse med forsøket var for stor. Da medisineringsforsøket ble avlyst, ble de reserverte midlene til dette planlagt brukt til en studie der effekten av snorkelmerd brukt mot lakselus skulle evalueres mhp effekt mot bendelorm. En studie er utført tidligere og publisert; Geitung et al 2020. I denne studien ble effekten av skjørt med ulik dybde evaluert mot infeksjon med bendelorm. I den nye studien skulle bruk av skjørt på ett av MOWIs oppdrettsanlegg i Rogaland, et område med høy prevalens og abundans av bendelorm (se resultater fra kohortstudiet) sammenlignes med lokaliteter uten skjørt. Det ble skrevet en protokoll for prøveuttak og de første prøvene ble tatt ut. Av forskjellige årsaker som ligger utenfor kontrollen til prosjektet ble prøveuttakene ikke fulgt opp fullstendig og noen prøver som ble sendt inn ble ødelagt fordi de tinet under transport. Etter avtale med FHF ble derfor dette skrinlagt og midlene overført til selve kohortstudien, der omfanget ble større enn opprinnelig planlagt.

9 Leveranser

Masteroppgaver

Ruud K (2019) Infection dynamics of marine *Eubothrium* sp. (Cestoda) in farmed Atlantic salmon. University of Bergen. <https://bora.uib.no/bora-xmloi/bitstream/handle/1956/24123/Avhandling-3-juni-final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sakariassen T (2019) Infestasjon med bendelorm (*Eubothrium* sp.) i oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) i sjø. University of Tromsø. <https://hdl.handle.net/10037/19370>

Foredrag

Presentasjoner på arbeidsmøte 31.05.2017

Sakariassen T, Ruud K, Sevatdal S, Karlsbakk E, Hansen H (2019) Infestasjon og smittedynamikk av bendelmark (*Eubothrium* sp.) i oppdrettslaks. Paper presented at the Frisk Fisk 2019, Tromsø, 2019-02-06 - 2019-02-07

Hansen H, Karlsbakk E, Ruud K, Sakariassen T, Darrud M, Sevatdal S (2019) Infestation and infection dynamics of tapeworms (*Eubothrium* sp.) in farmed Atlantic salmon. Paper presented at the 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Porto, 2019-09-09 - 2019-09-12

Planlagt foredrag

Frisk fisk 2022. Sevatdal, S., Karlsbakk, E., Ruud, K., Sakariassen, T. og Hansen, H. Infeksjonsdynamikk hos bendelorm (*Eubothrium crassum*) i sjøoppdrettet laks.

Vitenskapelige publikasjoner in prep

Sevatdal S., Hansen H, Ruud K, Sakariassen T, et al., and Karlsbakk E. Infestation and infection dynamics of tapeworms (*Eubothrium* sp.) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*).

Hansen H, Qviller, L., Sevatdal S., and Karlsbakk E. The geographic distribution of *Eubothrium* tapeworms in Norwegian fish farms.

Hansen et al in prep. The systematics of *Eubothrium* tapeworms based on full mitochondrial genomes.

Hahn et al. in prep. The complete genome of *Eubothrium crassum* and *Eubothrium salvelini*.

Hansen et al. in prep. Non-lethal detection of *Eubothrium crassum* in fish using anal swabs and real-time PCR.

10 Referanser

- Andersen, K., Kennedy, C.R., 1983. Systematics of the genus *Eubothrium* Nybelin (Cestoda, Pseudophyllidea), with partial re-description of the species. *Zoologica Scripta* 12, 95-105.
- Bais, S., Greenberg, R.M., 2020. Schistosome TRP channels: An appraisal. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 13, 1-7.
- Berland, B., Bristow, G.A., 1990. Bendelmark i laksefisk kan redusere veksten. *Norsk Fiskeoppdrett* 15, 42-43.
- Boyce, N., 2011. Effects of *Eubothrium salvelini* (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth and vitality of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Canadian Journal of Zoology* 57, 597-602.
- Bristow, G.A., Berland, B., 1989. *Eubothrium crassum* (Cestoda: Pseudophyllidea)- one species or two? Electrophoretic evidence for species status of sea-water and fresh-water forms. In: *The 14th Symposium of the Scandinavian Society for Parasitology*, Helsingør, Denmark, pp. 2-4.
- 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.
- Burroughs, A.M., Zhang, D., Schaffer, D.E., Iyer, L.M., Aravind, L., 2015. Comparative genomic analyses reveal a vast, novel network of nucleotide-centric systems in biological conflicts, immunity and signaling. *Nucleic Acids Res* 43, 10633-10654.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83, 575-583.
- Downes, J.K., Rigby, M.L., Taylor, R.S., Maynard, B.T., MacCarthy, E., O'Connor, I., Marcos-Lopez, M., Rodger, H.D., Collins, E., Ruane, N.M., Cook, M.T., 2017. Evaluation of Non-destructive Molecular Diagnostics for the Detection of *Neoparamoeba perurans*. *Frontiers in Marine Science* 4.
- Eysturskarð, J., Johannesen, Á., Eliassen, K., 2017. Application of real-time PCR for specific detection of *Lepeophtheirus salmonis* in fluid samples from lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) stomachs. *Aquaculture International* 25, 969-973.
- Fahy, E., 1980. *Eubothrium crassum* in migratory trout, *Salmo trutta* L., in the sea. *Journal of Fish Biology* 16, 99-104.
- Fjær, M.A., 2019. Pukkellaks (*Oncorhynchus gorboscha*) tatt på Vestlandet. - Hvilke parasitter og infeksjoner bærer de på? University of Bergen,
- Geitung, L., Wright, D.W., Stien, L.H., Oppedal, F., Karlsbakk, E., 2021. Tapeworm (*Eubothrium* sp.) infestation in sea caged Atlantic salmon decreased by lice barrier snorkels during a commercial-scale study. *Aquaculture* 541, 736774.
- Guillerault, N., Bouletreau, S., Iribar, A., Valentini, A., Santoul, F., 2017. Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus glanis* diet. *J Fish Biol* 90, 2214-2219.
- Gundersen, K.R., 1953. Zooplankton investigations in some fjords in Western Norway during 1950-1951. *Fiskeridirektoratets skrifter* (online) X, 54 pp.
- Hanzelova, V., Scholz, T., Gerdeaux, D., Kuchta, R., 2002. A comparative study of *Eubothrium salvelini* and *E. crassum* (Cestoda: Pseudophyllidea) parasites of Arctic charr and brown trout in alpine lakes. *Environmental Biology of Fishes* 64, 245-256.
- Haugslund, S., 2020. Fresh- or seawater eels, or mixed life history strategies: what do the parasites tell? University of Bergen,
- Hektoen, H. 1995. Miljøvirkninger av Havbruk. In *Sluttrapport til Forskningsrådet*.
- Hjeltnes, B., Walde, C.S., Jensen, B.B., Haukaas, A. 2016. *Fiskehelserapporten 2015* (Oslo, Norwegian Veterinary Institute).

- Hodneland, K., Solberg, P., 1995. Infection trials with marine *Eubothrium* in planktonic copepods, with aspects of proceroid development. In: The 4th International Symposium of Fish Parasitology, Munich, Germany, 3-7 October 1995, p. p. 71.
- Jansen, P.A., Kristoffersen, A.B., Viljugrein, H., Jimenez, D., Aldrin, M., Stien, A., 2012. Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. *Proc Biol Sci* 279, 2330-2338.
- Kennedy, C.R., 1978a. The biology, specificity and habitat of the species of *Eubothrium* (Cestoda: Pseudophyllidea), with reference to their use as biological tags: a review. *Journal of Fish Biology* 12, 393-410.
- Kennedy, C.R., 1978b. Studies on the biology of *Eubothrium salvelini* and *E. crassum* in resident and migratory *Salvelinus alpinus* and *Salmo trutta* and in *S. salar* in North Norway and the islands of Spitsbergen and Jan Mayen. *Journal of Fish Biology* 12, 147-162.
- Kralova-Hromadova, I., Scholz, T., Shinn, A.P., Cunningham, C.O., Wootten, R., Hanzelova, V., Sommerville, C., 2003. A molecular study of *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) (Cestoda: Pseudophyllidea) using ITS rDNA sequences, with notes on the distribution and intraspecific sequence variation of *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasit Res* 89, 473-479.
- Kralova, I., Hanzelova, V., Scholz, T., Gerdeaux, D., Spakulova, M., 2001. A comparison of the internal transcribed spacer of the ribosomal DNA for *Eubothrium crassum* and *Eubothrium salvelini* (Cestoda: Pseudophyllidea), parasites of salmonid fish. *Int J Parasitol* 31, 93-96.
- Kuchta, R., Shinn, A.P., Hanzelova, V., Scholz, T., 2006. A comparative study of the egg morphology in four species of *Eubothrium* (Cestoda: Pseudophyllidea) with comments on their early development. *Invertebrate Biology* 125, 1-8.
- Le Clec'h, W., Chevalier, F.D., Mattos, A.C.A., Strickland, A., Diaz, R., McDew-White, M., Rohr, C.M., Kinung'hi, S., Allan, F., Webster, B.L., Webster, J.P., Emery, A.M., Rollinson, D., Djirmay, A.G., Al Mashikhi, K.M., Yafae, S.A., Idris, M.A., Moné, H., Mouahid, G., LoVerde, P., Marchant, J.S., Anderson, T.J.C., 2021. Genetic analysis of praziquantel response in schistosome parasites implicates a transient receptor potential channel. *Science Translational Medicine*.
- Matthews, J.B.L., 1967. On the calanoid copepods of Raunefjorden, western Norway. *Sarsia*, 159-164.
- Norrbin, M.F., Olsen, R.E., Tande, K.S., 1990. Seasonal variation in lipid class and fatty acid composition of two small copepods in Balsfjorden, northern Norway. *Marine Biology* 105, 205-211.
- Nyberg, W., Gräsbeck, R., Saarni, M., Bonsdorff, B.v., 1961. Serum Vitamin B12 Levels and Incidence of Tapeworm Anemia in a Population Heavily Infected with *Diphyllobothrium latum*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 9, 606-612.
- Olson, P.D., Zarowiecki, M., Kiss, F., Brehm, K., 2012. Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite immunology* 34, 130-150.
- Rikardsen, A.H., Dempson, J.B., Amundsen, P.-A., Bjørn, P.A., Finstad, B., Jensen, A.J., 2007. Temporal variability in marine feeding of sympatric Arctic charr and sea trout. *Journal of Fish Biology* 70, 837-852.
- Rikardsen, A.H., Haugland, M., Bjørn, P.A., Finstad, B., Knudsen, R., Dempson, J.B., Holst, J.C., Hvidsten, N.A., Holm, M., 2004. Geographical differences in marine feeding of Atlantic salmon post-smolts in Norwegian fjords. *Journal of Fish Biology* 64, 1655-1679.
- Rosen, F., 1919. Recherches sur le développement des cestodes. 1. Le cycle évolutif des Bothriocéphales. *Bull. Soc. Sci. Neuchâtel. Nat.* 43, 241-300.
- Ruud, K., 2019. Infection dynamics of marine *Eubothrium* sp. (Cestoda) in farmed Atlantic salmon. University of Bergen,

- Sakariassen, T., 2019. Infestasjon med bendelorm (*Eubothrium* sp.) i oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) i sjø. University of Tromsø,
- Saksvik, M., Nilsen, F., Nylund, A., Berland, B., 2001a. Effect of marine *Eubothrium* sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 24, 111-119.
- Saksvik, M., Nylund, A., Nilsen, F., Hodneland, K., 2001b. 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. 48, 118-126.
- Scholz, T., Kuchta, R., Shinn, A.P., Snabel, V., Hanzelova, V., 2003. Host specificity and geographical distribution of *Eubothrium* in European salmonid fish. J Helminthol 77, 255-262.
- Sevatdal, S. 2008. Resistens hos bendelorm (*Eubothrium* sp.). In Sluttrapport til FHF pp. 1-21.
- Sevatdal, S. 2014. Validering av bioassay med praziquantel og bendelmark (*Eubothrium* sp.). In Sluttrapport til FHF pp. 1-17.
- Smith, H., 2011. Observations on the cestode *Eubothrium salvelini* in juvenile Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) at Babine Lake, British Columbia. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 30, 947-964.
- Snabel, V., Hanzelova, V., Scholz, T., Gerdeaux, D., Cabaret, J., 2004. Allozyme analysis of genetic variation and polymorphism in *Eubothrium salvelini* and *E. crassum* (Cestoda: Pseudophyllidea) from alpine lakes. Parasitol Res 93, 290-295.
- Sterud, E. 1999. Parasitter hos norske ferskvannsfisk (Oslo (in Norwegian), Norsk Zoologisk Forening).
- Ugedal, O., Kroglund, F., Barlaup, B., Lamberg, A. 2014. Smolt - en kunnskapsoppsummering (Miljødirektoratet), p. 128.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res 35, W71-74.
- Uye, S., 1985. Resting egg production as a life history strategy of marine planktonic copepods. Bulletin of Marine Science - Miami 37, 440-449.
- Vik, R., 1963. Studies of the helminth fauna of Norway. IV. Occurrence and distribution of *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779) and *Eubothrium salvelini* (Schrank, 1790) (Cestoda) in Norway, with notes on their life cycles. Nytt Magasin for Zoologi 11, 47-73.
- Wood, M., 2003. Making Sense of Statistics: A Non-Mathematical Approach, Palgrave study guides. Red Globe Press.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13, 134.
- Zar, J.H., 1984. Biostatistical analysis 2nd edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, USA.

11 Takk

- Magnus Lauringson, Estonian University of Life Sciences, for prøver av bendelorm, både fra ørret og *Coregonus maraena* fra Estland.
- Professor Evgeny P. Ieshko, Institute of Biology Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences for prøver av *Eubothrium* spp. fra laks, ørret og røye fra Russland.
- Professor Kurt Buchmann, Københavns Universitet, prøver av *Eubothrium* spp. fra laks fra Bornholm, Danmark.
- Maximilian Peinsteiner, ÖBf AG, for prøver av *Eubothrium* spp. ørret og røye fra Østerrike.
- Gunnar Öhlund, Universitetet i Umeå, Sverige for prøver av *Eubothrium* spp. fra ørret fra Sverige.
- Hampus Hällbom, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA, for prøver av *Eubothrium* spp. fra røye fra Sverige.
- Asgeir Rønningen for prøver av *Eubothrium* spp. fra ørret fra Storsjøen, Innlandet, Norge.
- Trygve T. Poppe for hjelp med fising av røye i Kjemsjøen, Innlandet og for prøver av *Eubothrium* spp. fra oppdrettslaks.
- Knut Poppe for utlån av hytte og god service under feltarbeid ved Kjemsjøen, Norge.
- Mads Sæther for svaberprøver fra laks fra VESO Viken klekkeri.
- Åse Garseth, Veterinærinstituttet for prøver av *Eubothrium* spp. fra laks og sjøørret i Norge.
- I tillegg takkes andre ansatte hos våre samarbeidspartnere:
 - o Linn Maren Strandenes, Synne Karoline Jerman Bjørstad og Cathrine Kalgraff i Lerøy
 - o Marianne Elnæs, Kari Marie Bortveit, Randi Vaage Thon, Mari Viken Kjørstad, Håvard Hustoft og Liv Birte Rønneberg i Mowi AS
 - o Thomas Amlie i Åkerblå AS.

12 Liste over figurer

Figur 1 Forbruk av legemidler mot bendelorm i akvakultur i Norge (Data fra Folkehelseinstituttet https://www.fhi.no/hn/legemiddelbruk/fisk/2021-bruk-av-legemidler-i-fiskeoppdrett/).....	9
Figur 2 Skjermbilde fra spørreundersøkelsen (Excel) som ble sendt ut til fiskehelsetjenester og oppdrettsfirmaer.....	14
Figur 3 Kart som viser utbredelsen til <i>Eubothrium</i> sp. i 333 norske oppdrettsanlegg. Datapunktene er basert på resultater fra en spørreundersøkelse. Røde sirkler=påvist minimum én gang på lokaliteten, Grønne sirkler= ikke påvist. Blå linjer omkranser de 13 forskjellige produksjonsområdene i norsk oppdrettsnæring med PO1 lengst sør og PO13 lengst i nord.	17
Figur 4 Søylediagram som viser andelen av positive og negative oppdrettsanlegg gruppert etter produksjonsområde (PO). Resultatene stammer fra en spørreundersøkelse. PO1 og 2 er slått sammen da det var få observasjoner for disse to områdene. Et oppdrettsanlegg ble regnet som positivt hvis <i>Eubothrium</i> sp. hadde vært påvist minst en gang ved anlegget.	18
Figur 5 Plot som viser effekt av de fire forklaringsvariablene i modellen, henholdsvis oppdrettstetthet, utsettesong, breddegrad og vekt ved utsett. Merk at vekt ved utsett har noen til dels veldig høye verdier. Dette skyldes sannsynligvis at noen av kohortene har blitt flyttet, slik at første registrering av vekt på lokaliteten har kommet langt ut i produksjonssyklus.....	19
Figur 6 Kart som viser lokalitetene for prøver brukt til genomanalyser av bendelorm i slekten <i>Eubothrium</i> . Se tabell 1 for detaljer.....	24
Figur 7 Figur som viser organiseringen av det mitokondrielle genomet til <i>Eubothrium crassum</i> fra en oppdrettslaks, <i>Salmo salar</i>	29
Figur 8 Slektskapsanalyse basert på hele det mitokondrielle genomet fra 20 isolater av <i>Eubothrium</i> (Esal= <i>E. salvelini</i> , Ecra= <i>E. crassum</i>), fra forskjellige verter (Sa= <i>Salvelinus alpinus</i> , Ss= <i>Salmo salar</i> , St= <i>S. trutta</i>) og geografiske lokaliteter. Tre isolater av <i>E. salvelini</i> fra røye (<i>S. alpinus</i>) er brukt som utgruppe i analysen.	30
Figur 9 Slektskapsanalyse basert på genomiske data av 20 individer av <i>Eubothrium</i> fra forskjellige verter og geografiske lokaliteter. Tre isolater av <i>E. salvelini</i> fra røye (<i>Salvelinus alpinus</i>) er brukt som utgruppe i analysen. Fargene på benevnelsen til de forskjellige individene representerer art av <i>Eubothrium</i> (Esal= <i>E. salvelini</i> , Ecra= <i>E. crassum</i>), fiskevert (Sa= <i>S. alpinus</i> , Ss= <i>Salmo salar</i> , St= <i>S. trutta</i>) og gruppering i treet og er forklart til høyre i treet.	31
Figur 10 En sammenstilling (alignment) av SLOG-domenet fra <i>Schistosoma japonicum</i> (n=2), <i>S. mansoni</i> (n=1), <i>Eubothrium salvelini</i> (n=1), <i>E. crassum</i> fra innlandsørret, <i>Salmo trutta</i> (n=1) og <i>E. crassum</i> fra oppdrettslaks, <i>S. salar</i> , i sjø (n=2). Figuren viser at deler av domenet mangler hos de to individene fra oppdrettslaks.	31
Figur 11 Illustrasjon av ikke-invasiv metode for påvisning av bendelorminfeksjoner i fisk. Metoden består av prøvetaking med svabre fra gattåpningen (1+2), DNA ekstraksjon (3) og påvisning med sanntids-PCR (4+5). Designet i BioRender.com.....	32
Figur 12 Kart som viser plasseringen til oppdrettsanleggene som var en del av kohortstudien (se detaljer i Tabell 9).	36
Figur 13 Stadier av <i>Eubothrium</i> sp. fra oppdrettslaks i sjø. A: Plerocercoid, B: Egg med hexacanth larve inni, denne har tre par kroker som er synlige. Egget måler ca 0.1 mm i lengde. C: Liten umoden (juvenil) bendelorm, scolex er utviklet med apical skive og sugefurer (bothria), og få proglottider. D: Scolex hos voksent individ. E: Scolex og nakkeregion av	

voksent individ. F: Segment med sagtakket strobila som er typisk for <i>Eubothrium crassum</i> . Målestokkene representerer 0.5 mm i bildene A, D,E og F, og 1 mm i C (fra Ruud, 2019).	40
Figur 14 Infeksjonsdynamikken til <i>Eubothrium</i> sp. i kohorter av oppdrettslaks fra Rogaland og Hordaland. Stiplet linje viser prevalens, og solid linje er snitt abundans (begge med konfidensintervaller (95%). Blå piler viser tid for sjøsetting. Stjernene indikerer signifikant endring. Blå stjerner er endring i prevalens, basert på Fisher's eksakt test (FET). Svarte stjerner indikerer endring i abundans, testet med Mann-Whitney tester. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001. Signifikant økning (stjerner) i prevalens og/eller abundans er bevis for en pågående infeksjon.....	43
Figur 15 Oversikt over alle de studerte vår og høstutsatte laksekohortene. Perioder med signifikant økning i prevalens eller abundans er markert i sort, ingen endring er markert som grønt. I tillegg angir tykkelsen av linjen grad av signifikans (tynn sort P<0,05, medium P<0,01, tykk P<0,001). Infeksjonspresset gjennom året som kan tolkes ut fra disse vurderingene er visualisert i B.	45
Figur 16 Forekomst av svært små bendelormlarver uten ledd (plerocercoider, innsatt bilde) i oppdrettslaksen i forhold til fiskens lengde. En har gjennomsnittlig flest plerocercoider i fisk som er mindre enn 30 cm lange. N, antall fisk i kategori; NEc, antall <i>Eubothrium</i> sp. i kategori. Målestokken i bildet av plerocercoiden er 0.5 mm lang, og er representativ for begge bildene. Bildene er tatt av Marte Andrea Fjær.	45
Figur 17 Kondisjonsfaktor ($K\text{-faktor} = 100 * (\text{vekt} / (\text{lengde})^3)$) for kohort satt ut i sjøen høsten 2017, kohort 1, 4, 5 og 6. Kohort 6 var på en lokalitet C, der det ble påvist PD i mars 2018, dvs i perioden mellom SV 2 - SV 3. Kohort 6 ble slaktet ut kort tid etterpå. Feilfelt er SD. ...	48
Figur 18 Kondisjonsfaktor ($K\text{-faktor} = 100 * (\text{vekt} / (\text{lengde})^3)$) for kohort satt ut i sjøen våren 2018, kohort 10, 11, 12 og 13. Feilfelt er SD.	49
Figur 19 Predikert forskjell i vekt mellom de ulike kategoriene under «Påvisning» hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.	51
Figur 20 Prediksjon av tilvekst over tid for alle kategorier som inngår i variabelen «Påvisning», hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.	52
Figur 21 Predikert forskjell i gjennomsnittlig fôrforbruk mellom de ulike kategoriene under «Påvisning» hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.	53
Figur 22 Prediksjon av gjennomsnittlig fôrforbruk over tid for alle kategorier som inngår i variabelen «Påvisning» hvor 0= ikke påvist, 1= lite, 2= middels og 3= mye. Kategoriene henviser til hvor stor andel av fisken på anlegget som ble anslått å være infisert (se 7.1.3.1). Alle andre variabler er satt til gjennomsnitt i datasettet.	54

13 Liste over tabeller

Tabell 1 Modelltabell som viser effekter av forklaringsvariabler (uten random effekt) fra den beste modellen. Merk at oppdrettstetthet og vekt ved utsett er logtransformert for komme nærmere normalfordeling i forklaringsvariablene, mens breddegrad ble skalert for å kunne identifisere effekter bedre i modelltilpasningen.....	18
Tabell 2 Fordelingen av vår- og høstutsett i de forskjellige produksjonsområdene (PO1-8)....	21
Tabell 3 Oversikt over prøver som ble samlet inn til de genetiske analysene, med dato (år) for innsamling, vert, lokalitet, fylke/region, land, lokalitetens utløp i sjø, habitat, biologien til fisken og sekvenseringsteknologi og mengde data sekvensert per prøve for de forskjellige teknologiene. Verter: <i>S. salar</i> = <i>Salmo salar</i> (Atlantisk laks), <i>S. trutta</i> = <i>Salmo trutta</i> (ørret), <i>O. mykiss</i> = <i>Oncorhynchus mykiss</i> (regnbueørret). Land: NO= Norge, DK=Danmark, SE=Sverige, AT=Østerrike, EE=Estland, RU=Russland. Habitat: F=Ferskvann, S=Saltvann, B=Brakkvann. Utløp i hav: ATL=Atlanterhavet, Øst=Østersjøen, Kvit=Kvitsjøen, Sva=Svartehavet. Type fisk: Vst=Villfisk, stasjonær, Van=Villfisk, anadrom, Vsj=Villfisk, sjø, Opp=oppdrett. *: resultater for denne prøven var ikke mottatt fra sekvenseringsfirmaet da rapporten ble skrevet.	25
Tabell 4 Prøver benyttet i utvikling og testing av metode for en ikke-invasiv påvisning av bendelorminfeksjoner i fisk.	26
Tabell 5 Primere og prober for sanntids-PCR-påvisning av ribosomalt 18S DNA og mitokondrielt Cytokrom oksidase I (COI) DNA fra <i>Eubothrium crassum</i> utviklet i dette prosjektet.	27
Tabell 6 Amplifikasjonseffektivitet og linearitet for de to PCR-metodene målt ved analyse av to 10x fortynningskurver med 5 fortyninger hver.....	28
Tabell 7 Sanntids-PCR-resultater for analyser av DNA fra <i>Eubothrium salvelini</i>	33
Tabell 8 Kvalitative resultater for sanntidsanalyser av 18S og COI for et sett med svaberprøver tatt fra laks med kjent infeksjon av <i>Eubothrium</i> . Negative kontroller er ikke vist i tabellen. .	33
Tabell 9 Beskrivelse av lokaliteter og kohorter som var med i kohortstudien. Lokaliteter er vist på kart i figur 9. Fiskelengde er gjennomsnittslengde ved utsett.	37
Tabell 10 Tabell som viser dato for prøveuttak i kohortstudien. Antall fisk ved hvert prøvetaking var i utgangspunktet 30, med noen unntak: ^A :n = 22, ^B :n = 20, ^C :n = 18, ^D :n =28, ^E :n=27, ^F : n=29, ^G :n=21, ^H :n=27, ^I :n=21, og ^J :n=18. Datoer som er understreket viser prøveuttak som ikke ble analysert (se teksten for forklaring).	38
Tabell 11 Beskrivelse av kategorier for de ulike utviklingsstadiene av bendelorm.	39
Tabell 12 Tabellen viser oppsummerte resultater fra kohortstudien Gjennomsnittlig antall parasitter pr fisk fordelt på de ulike stadiene som ble funnet fra uttak i sjøvann (SV 1 - SV 6). Prøver fra ferskvann er ikke tatt med da alle var negative. Stadiene er forklart i tabell 11... 42	42
Tabell 13 Gjennomsnittsvikt med standard avvik (SD) for de forskjellige kohorter. Merk at tiden mellom prøveuttakene varierer noe for hver kohort.	48
Tabell 14 Beskrivelse av produksjonsdata for kohorter i kohortstudien. Alle data var ikke tilgjengelig for alle kohorter. <i>Biologisk fôrfaktor: Forholdet mellom antall kilo forbrukt fôr og antall kilo tilvekst på fisken. Økonomiske fôrfaktor: Tar også hensyn dødelighet under produksjonen.</i>	50
Tabell 15 Modellparametere fra den beste modellen som beskriver vekt som en effekt av påvisning og relevante kovariater.	51
Tabell 16 modellparametere fra den beste modellen som beskriver fôrforbruk som en effekt av påvisning og relevante co-varianter.	53
Tabell 17 Genome summary statistics	70

Tabell 18 A summary of the predicted copy number variation in TRP (transient receptor potential cation channels) genes	72
--	----

14 Appendiks

14.1 Appendiks 1: Detaljert beskrivelse av DNA-ekstraksjon, genomsekvensering og bioinformatikk (på engelsk)

14.1.1 Materials and methods

To obtain a comprehensive picture of the genomic diversity of *Eubothrium* spp. samples were strategically selected to cover the variation in life history traits throughout its European distribution, although with a strong focus on Norway (Tabell 3 and Figur 6). Thus, we included samples from marine farmed, as well as, wild salmon, on the one hand, but also samples from marine, as well as land-locked freshwater, brown trout (*Salmo trutta*) populations. As an outgroup we included three samples from *Eubothrium salvelini* from Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), covering a comparable geographic range as for *Eubothrium* spp. from the other hosts.

Genomic DNA was extracted using the Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research) following the manufacturer's instructions with minor modifications, initial incubation overnight, and elution in 2 × 50 µL after 10 min incubation at room temperature each. DNA quantity was assessed using a Qubit 4.0 fluorometer and the Qubit dsDNA BR Assay. DNA integrity was assessed on an Agilent TapeStation system. Library preparation (Illumina TruSeq Nano, 550 bp insert size) and sequencing on the NovaSeq6000 (2× 150 bp) platform were outsourced (Macrogen Europe). Long read library preparation was performed using Oxford Nanopore's 'Genomic DNA by ligation' (SQK-LSK112) protocol. Libraries were sequenced on the ONT MinION system (flowcell type 10.4). For selected samples, RNA was extracted using the Promega ReliaPrep™ RNA extraction system, following the manufacturer's instructions. Libraries for RNA sequencing were prepared using the stranded Truseq mRNA protocol and sequencing was performed (2x150bp, Novogene 6000) by Macrogen Europe. Four samples were strategically chosen as reference samples, for which we targeted 100x genome coverage by generating 90Gbp worth of data for de novo genome assembly. Long reads were generated for two samples to improve genome assembly. The remainder of the samples were sequenced to lower coverage (10-20x), to allow for reliable SNP calling. Whole transcriptome data was generated for three samples to aid downstream structural genome annotation and train ab-initio predictors.

Long and short read data processing and genome assembly was done through a custom, fully automated pipeline developed in the Hahn lab at University of Graz (<https://github.com/chrishah/demogenas>). In brief, short reads were quality checked using FastQC and adapter and quality trimmed using TrimGalore. Kmers were counted using KMC3 and initial genome size estimates were obtained using GenomeScope based on the kmer frequency distribution (see links to *GenomeScope* below). Subsequently, error correction was performed using BLESS and corrected read pairs were merged using USEARCH. Genome assemblies based on the short reads were performed using SPAdes, Minia, ABySS, and Platanus at different processing stages (trimmed, error corrected, merged). The optimal kmer length for genome assembly (relevant for ABySS and Minia) was identified using KmerGenie. Long MinION reads were basecalled with Guppy and error corrected using the corrected Illumina reads using Ratatosk. Long reads were utilised for genome assembly by 1) scaffolding Illumina only assemblies using Dentist, 2) hybrid assembly using SPAdes and HASLR, and 3) long read denovo assembly using CANU and Flye. The contiguity of all assemblies per sample was assessed using Quast. Assembly completeness was evaluated using BUSCO and potential host

contamination was assessed using Blobtools. For each sample the assembly with the best performance in terms of contiguity (e.g. N50) and estimated gene space completeness (BUSCO) was selected for downstream genome annotation. Transcriptome reads were trimmed using Trimalore and assembled using Trinity. Full mitochondrial genomes were assembled with MITObim, using a COI sequence of *Eubothrium crassum* and *E. salvelini* downloaded from Genbank (accession numbers: KR780781 and KR780824) as seed.

Genome annotation was again done through a custom pipeline developed in Graz (<https://github.com/reslp/annocomba>). In brief, core eukaryotic genes were identified in the assemblies using CEGMA and BUSCO (reference set metazoa). The latter was run with the '--optimize_augustus' option to train the ab-initio gene predictor AUGUSTUS in the process. Genes identified by CEGMA were used to train the ab-initio gene predictor SNAP. Species specific repeats were identified using RepeatModeler and subsequently masked in the genome assemblies with RepeatMasker. The ab-initio gene predictor Genemark was run on the repeatmasked genomes. As protein evidence further informing downstream gene prediction we concatenated the complete UniProt database and all available complete protein complements of parasitic flatworms as downloaded from NCBI Genbank and WormBase ParaSite (accessed 02.02.2022) KR780824. To remove redundancy in the reference protein set it was clustered at 98% similarity using CDHIT-est. Further, gene prediction was performed in two passes. First, using MAKER2 on the repeatmasked genome, incorporating the physical protein and transcriptome evidence, and using the SNAP models obtained above. The gene models of this initial gene prediction with MAKER2 (only genes with aed evidence score < 0.2) were used to retrain the ab-initio predictors Augustus and SNAP. In a second pass, MAKER2 was rerun combining all evidence and the predictions from Augustus, Genemark, and SNAP. The set of gene models obtained was functionally annotated via Funannotate which combined results from Interproscan, a similarity search against the complete UniProt database using DIAMOND, and a search against the complete EGGNog database using EGGNOG. Genome annotation was performed independently for each of the four reference samples. Orthologous groups were identified in the predicted gene complements together with that of *Schistosoma mansoni* (Genbank accession: GCA_000237925.5). Candidate genes previously reported as associated with drug resistance in *Schistosoma mansoni*, e.g. Sm.TRMPZQ (Smp_246790 in GCA_000237925) (Le Clec'h et al., 2021) were identified in the *Eubothrium* genomes via this orthology search. Mitochondrial genomes were annotated using MITOS webserver.

Reads from low coverage samples were trimmed using Trimalore and mapped to the best scoring genome obtained for the *Eubothrium crassum* and *E. salvelini*, respectively, using bowtie2. PCR duplicates were removed using MarkDuplicates from the Picard software suite. SNPs were called using samtools mpileup and the script vcfutils (vcftools) was used to extract the consensus whole genome sequence for each sample. For all 1:1 orthologs, i.e. orthologous groups that contained only one paralog in each of the denovo assembled genomes, as well as *S. mansoni*, coding sequences were extracted, aligned at amino acid level using clustal v and converted back to nucleotide level using Pal2Nal v. Alignments were trimmed using trimAl v. IQTree v was used to infer the phylogenetic relationships using two sets of genes: 1) 18S rDNA + 12 mitochondrial coding genes, and 2) 3000 single copy orthologous nuclear genes. Datasets were partitioned according to gene, with the best model of evolution per partition chosen by IQTree's ModelFinder.

14.1.2 Results & Discussion

We assembled 23 full mitochondrial genomes for *Eubothrium* isolates collected across Europe (Tabell 3). Apart from one unverified mt genome for Bathybothrium sp. (Genbank accession MW130856) these represent the first full mt genomes for members of the family

Triaenophoridae. Based on automated annotation and subsequent manual curation we consistently identified 12 coding-, 2 rDNA, and 22 tRNA genes contained in the mt genomes. Overall gene content and organisation is as previously reported for representatives of the order Bothriocephalidae (Figur 7). Furthermore, we assembled draft nuclear genomes for four isolates of *Eubothrium crassum* and one of *E. salvelini*, *denovo*, the first representatives for the order. Summary statistics can be found in Tabell 17. In brief, the most contiguous assemblies based on Illumina data were of consistently good quality with N50 ranging from 15 to 16 kb and total assembly size of around 420 Mbp. BUSCO completeness was highly consistent at about 85%. CEGMA completeness estimates based on the most conserved set of genes (group 4) was ~93%.

Tabell 17. Genome summary statistics

Isolate	scaffolds	GC [%]	N50 [bp]	assembly span [bp]	BUSCO [%]	CEGMA (group 4) [%]	# predicted genes	
EcrRog_Ssfm	48500	37.92	16193	410503314	85.2	93.85	21285	abyss-trimgalore-bless-usearch
EcrTro_Ssfm	52477	37.97	15965	439398570	84.3	96.92	22379	abyss-trimgalore-bless
EcrFus_Stwr	48950	38.03	17290	447217394	86.7	93.85	17781	abyss-trimgalore-bless
EcrSto_Stwr	48981	30.93	15174	405954897	84.2	92.77	17931	abyss-trimgalore-bless
Esakje_Sawr	49271	38.28	17596	470860339	85.5	93.85	17807	abyss-trimgalore-bless
Esakje_Sawr	28007	38.72	96388	1093722611	90.9			flye-guppy-ratatosk

For comparison, the genome of the Diphyllbothriid tapeworm *Dibothriocephalus latus* with comparable genome size of 531 Mbp, is currently assembled to 140294 scaffolds, with N50 of 6.7 kb (source Wormbase ParaSite WBPS16) and BUSCO/CEGMA completeness of 75.3 % and 81.5%, respectively. The genome assembly based on long Nanopore reads only for *E. salvelini*, improved the quality further. However, a hybrid assembly strategy combining short Illumina and long Nanopore reads attempted for *E. crassum* (Ecr_Stj_Ss-w) yielded an inferior result (data not shown), and was omitted from subsequent analyses at this time. For consistency, downstream analyses (genome annotation, etc.) were performed based on Illumina assemblies only. The number of genes predicted in the five draft genomes was relatively consistent, ranging from 17800 to 22000. Overall, we identified 10411 orthologous gene clusters with genes identified in all four isolates. 3243 gene clusters contained paralogs in at least one isolate of *E. crassum*. The larger numbers of genes identified in *Eubothrium* isolates from marine farmed salmon appears to be caused by an increased number of gene duplications. Indeed, 353 orthologous gene clusters contained consistently higher copy numbers in isolates from farmed salmon, compared to isolates from resident trout. In 63% of these clusters the number of paralogs was found identical in the independent isolates from the same host species. A list of the orthologous gene clusters with their representation across isolates and functional annotation is deposited permanently in a designated online repository (Zenodo). We have also identified orthologous genes to transient receptor potential cation channels TRP thought to be targets of Praziquantel, including the gene TRPM_{PZQ} (Smp_130890) recently implicated in resistance to Praziquantel treatment in *Schistosoma mansoni* ref. Interestingly, in the orthologous gene cluster including *S. mansoni* TRPM1 (Smp_198800.1), which is phylogenetically closest to TRPM_{PZQ} (Bais and Greenberg, 2020) appears duplicated in both isolates from farmed marine salmon, while represented by only a single copy each in the two isolates from resident trout. A summary of the predicted copy number variation in TRP genes is shown in Tabell 18. The TRPM_{PZQ} orthologues in isolates from farmed marine salmon were predicted to be missing substantial parts of the SLOG-domain (Figur 10). The latter is thought to play a regulatory role for the channel in potentially recognizing a universal nucleotide or nucleotide- derived ligand (Burroughs et al., 2015). Whether any of these findings are causally linked to the usage of and play a role in beginning resistance to Praziquantel can not be

reliably inferred based on the sample size of this study, but certainly merits further investigations. Designing a targeted screening assay for TRPM variants should be straightforward based on the information provided by this project. Genome wide heterozygosity (proportion of heterozygous nucleotides, not considering indel variation) ranged from <0.2% in *Eubothrium* isolates from resident hosts (e.g. EsaKje_Sawr, EcraHal_Stw, EcrFus_Stwr) to >0.4% in isolates from wild and farmed salmon (e.g. EcrTro_Ssfm, EcrAdl_Ssw, EcrSki_Ssw), most likely reflecting larger effective population sizes in marine environments.

The phylogenetic hypothesis inferred based on the full set of 12 mitochondrial coding-, plus 12S and 16S ribosomal genes, and 18S rDNA is shown as Figur 8. Here, *E. crassum* appears split into two well supported groups. One clade contains exclusively samples from Norwegian Atlantic salmon, whereas the second clade contains both *E. crassum* from salmon and trout across its European distribution, including Norway. There doesn't seem to be a clear pattern with respect to geographic distribution or host relevant factors determining the groupings recovered in the mitochondrial data. The most likely explanation based on this analysis is that the groups represent genetic lineages originating from separate glacial refugia, having expanded into Norway independently after the last glacial maximum.

The phylogenetic hypothesis based on nuclear genomic markers is shown in Figur 9. It is based on 3300 single copy orthologous genes, total DNA alignment length of 1279066 bp, trimmed to contain only positions for which sample coverage was 100%. This analysis again separates two major well supported groups, one containing exclusively parasites from salmon the other containing worms from both host species. However, the grouping is not congruent with the one observed based on mt DNA. Strikingly though, in this analysis, higher level clades group samples obtained from the same host species with high support. While all samples from trout cluster together, samples from salmon cluster into two to three subclades that show some geographic structure. The first split separates samples from Baltic and North/Norwegian sea isolates of salmon. Within the latter group there is a further clear divide inferred which does not, for the most part, correspond to the overall geographical distribution of the samples. Wild salmon conduct the infection with *E. crassum* during their long marine phase in the North/Norwegian Sea and a clear geographic structure is thus not necessarily to be expected. It is noteworthy however, that samples from Drammenselva and Enningdalselva, both in the Oslo fjord, cluster together. Also interesting, the samples from farmed marine salmon taken at Trøndelag and Rogaland cluster together, however with low support, despite the substantial geographic distance. This pattern can neither be explained by migration of the intermediate nor final hosts of *E. crassum*. The present study provides important insights into the genomic diversity of *E. crassum* across large parts of Europe and establishes the larger context for further investigations. These should focus on the genomic structure of *E. crassum* in farmed salmon, whether farm environments are indeed dominated by certain genotypes of *E. crassum*, and furthermore, whether selection through treatment etc. is indeed an important factor that is likely going to increase in relevance in the future.

GenomeScope

EsaKje - <http://genomescope.org/analysis.php?code=OqSLWkUHOKLd30A5RTzn>

EcrRog_Ssfm - <http://genomescope.org/analysis.php?code=NtkVK7gIL5yB3ZZLitG4>

EcrTro_Ssfm - <http://genomescope.org/analysis.php?code=EtPwde4PNXNg4PtI8yDr>

EcrFus_Stwr - <http://genomescope.org/analysis.php?code=bKNM7TfqUm8yLhsGpio8>

EcrSto_Stwr - <http://genomescope.org/analysis.php?code=xRnN617t10KUDZyYh2s2>

Tabell 18. A summary of the predicted copy number variation in TRP (transient receptor potential cation channels) genes

Orthogroup	EcrFus_Stwr	EcrSto_Stwr	EcrRog_Ssfm	EcrTro_Ssfm	S.mansoni ortholog	TRP subtype
OG0002746	1	1	1	1	Smp_130890	M1
OG0000476	1	2	4	1	Smp_000050	M2
OG0004257	1	1	1	1	Smp_165170	M3
OG0000522	3	2	2	2	Smp_333650	M7
OG0006313	1	1	1	1	Smp_147140	M7
OG0001033	1	1	2	2	Smp_198800	ML
OG0000646	2	1	2	2	Smp_246790	MPZQ
OG0001266	1	1	1	1	Smp_246790	MPZQ

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!



Veterinærinstituttet
— Norwegian Veterinary Institute

Ås

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no
www.vetinst.no