

Olav Hermund Aasberg  
Eirin Jetmundsen Eknes

# Historisk resistensutvikling for organofosfat og pyretroid hos lakselus (2002-2022)

Bacheloroppgave i Biomarin Innovasjon

Veileder: Lars C. Gansel

Medveileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2022



Olav Hermund Aasberg  
Eirin Jetmundsen Eknes

# **Historisk resistensutvikling for organofosfat og pyretroid hos lakselus (2002-2022)**

Bacheloroppgave i Biomarin Innovasjon  
Veileder: Lars C. Gansel  
Medveileder: Ann-Kristin Tveten  
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



## Forord

Bacheloroppgaven er skrevet våren 2022. Oppgaven tar for seg utviklingen av pyretroid- og organofosfat-resistens hos lakselus i perioden 2002-2022. Det har vært ønskelig å kartlegge dagens resistenssituasjon med intensjon om å kunne anbefale eller fraråde bruk av kjemikaliene.

Gjennom studiet har studentene delt en interesse for havbruk og utfordringene næringen står ovenfor, da både de biologiske og økonomiske. Oppgaven har belyst våre interesser og la grunnlaget for valg av videre utdanning.

Takk til våre veiledere Lars C. Gansel, Ann-Kristin Tveten og Anne Stene for god akademisk veiledning.

## Sammendrag

Havbruksnæringen anses som den nye oljen, men hemmes av biologiske faktorer som lakselus. Parasitten presser laksenæringens profittmarginer, muligheten til å opprettholde god fiskevelferd og ivareta nærliggende økosystemer. Det benyttes ulike avlusningsmetoder for å holde lusepåslag nede, hvorav kjemiske har vært foretrukket. Stor bruk i Romsdalsfjorden og Storfjorden frem til 2016 ga resistente lusepopulasjoner, nedsatt effekt og derav utfasing av organofosfat og pyretroider. I denne oppgaven har vi analysert lus fra Dryna og Gudmundset og funnet resistens-gen for begge kjemikaliene. Resultatene viser at 42% av testet lus var resistent mot pyretroider og at 10% sannsynligvis var resistent mot organofosfat. Analysene baserer seg på et begrenset antall prøver og er ikke representativt for lusepopulasjonene, men kan gi en pekepinn på dagens situasjon. Det diskuteres videre om resistensnivåene kan skyldes krysskontaminering mellom nærliggende anlegg, et latent gen i populasjonen, og/eller feil bruk av kjemikalier. Resistensnivået av pyretroider er svært høyt og en gjeninnføring frarådes.

Andelen sensitive lakselus mot pyretroider er nå rundt 1/3 på Dryna og 1/2 på Gudmundset. En avlusning med 50% overlevelse blant lus er ikke effektiv. For å kunne ha en effektiv behandling uten overdrevne konsentrasjoner bør resistensnivået senkes ytterligere. Da til rundt samme målte nivåer som organofosfat, eller ideelt sett 0%. Ved en gjeninnføring av samtlige kjemikalier i et fravær av resistens, kan behandlingene kontrolleres, rulleres og resistensutvikling minimeres. Utviklingen bør følges over tid med et oppskalert volum på prøvetakningen. Mer sikkerhet kan eventuelt fastsette en beslutning rundt gjeninnføring av pyretroider og eller en eventuell utfasing av organofosfat.

## Abstract

Aquaculture is considered the new oil, but the industry is hampered by biological factors, such as salmon lice. The parasite challenges profit margins, the opportunity to maintain good fish welfare and safeguard nearby ecosystems. Various de-licing methods are used to keep lice infestation down, of which chemical-based methods has been preferred. Extensive use in Romsdalsfjorden and Storfjorden until late 2016 resulted in resistant lice populations, reduced efficiency, and consequentially an outfacing of organophosphate and pyrethroids. In this thesis the students have analyzed lice from Dryna and Gudmundset and found a resistance gene for both chemicals. The results show that 42% of the lice tested were resistant to pyrethroids and that 10% probably were resistant to organophosphate. The analyzes are based on a limited number of samples and are not representative of the lice populations but can give an indication of the current situation. A partially high level of resistance after a long absence of chemicals may be due to cross-contamination between nearby plants, a latent gene in the population, and / or incorrect use of chemicals. The level of resistance against pyrethroids is substantial, and a reintroduction is therefore consequently not recommended. The proportion of sensitive salmon lice against pyrethroids is now approx. 1/3 on Dryna and 1/2 on Gudmundset. A de-licing with a near 50% survival among lice is not efficient. Thus, to maintain a certain level of efficiency, without excessive concentrations, the level of resistance should be lowered further. The result should amount to the same as measured levels of organophosphate, or ideally 0%. By reintroducing all chemicals in the absence of resistance, the treatments can be controlled, varied and the development of resistance minimized. Developments should be monitored over time with a scaled-up volume of sampling, to determine a decision to reintroduce pyrethroids or even a possible phasing out of organophosphate.

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Introduksjon .....</b>	<b>5</b>
<i>1.1 Lakselus.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2 Avlusningsmetoder.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3 Resistensutvikling.....</i>	<i>8</i>
<i>1.4 Analysemetoder for studier av resistensutvikling hos lakselus.....</i>	<i>13</i>
<i>1.5 Problemstilling .....</i>	<i>14</i>
<b>2. Material og Metode.....</b>	<b>15</b>
<i>2.1 Prøvemateriale .....</i>	<i>15</i>
<i>2.2 DNA-isolering .....</i>	<i>15</i>
<i>2.3 qPCR/Real-time PCR.....</i>	<i>16</i>
<b>3. Resultat.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>23</b>
<i>4.1 Virkning av behandlingsmetoder mot lakselus .....</i>	<i>23</i>
<i>4.2 Utvikling i resistens hos lakselus (2002-).....</i>	<i>26</i>
<i>4.3 Veien videre.....</i>	<i>29</i>
<b>5. Konklusjon .....</b>	<b>30</b>
<b>Referanser.....</b>	<b>31</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>34</b>
<i>Vedlegg 1.....</i>	<i>34</i>
<i>Vedlegg 2.....</i>	<i>34</i>
<i>Vedlegg 3.....</i>	<i>35</i>
<i>Vedlegg 4.....</i>	<i>35</i>



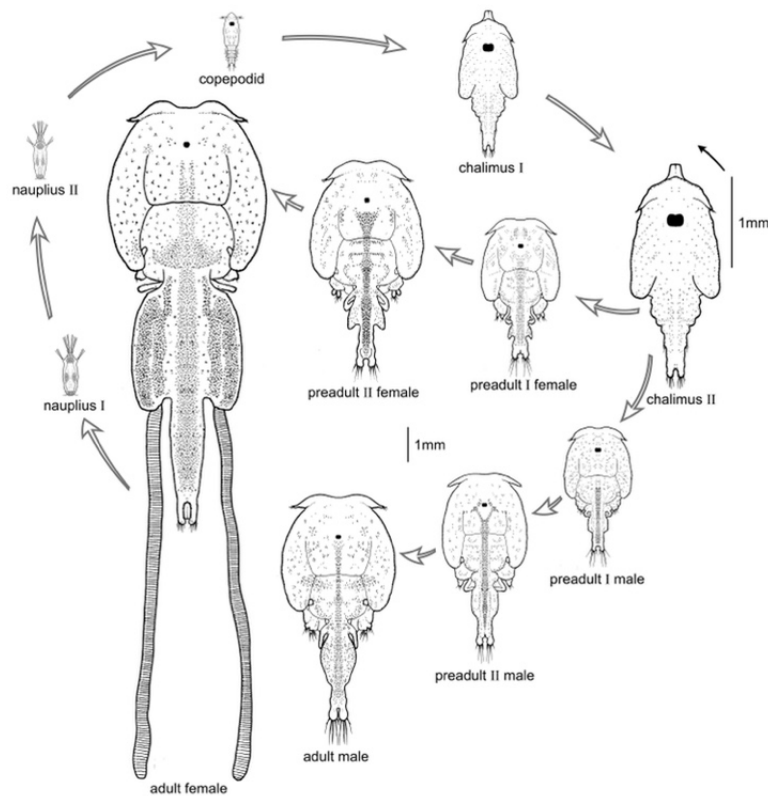
# 1. Introduksjon

De siste 20 årene har salgsvolumet i den norske havbruksnæringen økt fra 200.000 tonn laks i 1998 til 1.8 millioner tonn i 2018 (Baklien, 2020). Havbruk er nå Norges største eksportnæring etter petroleum. Solberg-regjeringen la i 2017 frem «regjeringens havstrategi» som legger opp til en dobling i antall årsverk innen 2030 og en femdobling innen 2050. (Regjeringens Havstrategi, 2017). Forholdet mellom villaks og oppdrettslaks er i dag 1:1000, og det store volumet byr på utfordringer både for miljø og produkt (Naturvernforbundet, 2020). En stor biomasse på et begrenset areal gir økte forekomster samt spredning av bakterier, virus og parasitter. Ved lusepåslag følger et svekket immunforsvar, da fra selve lusen, men også den kommende avlusningen (Veterinærinstituttet, no date). De siste årene har forekomster av CMS (hjertesprekk) hatt en markant økning hvor sykdommen linkes til belastning under avlusning (Amundsen, 2022). Luseproblematikken begrenser nye konsesjoner hvilket er høyst problematisk for en næring i vekst. Laksepriser har hatt en jevn økning, og i andre kvartal av 2022 ligger den på 107kr/kg. Etterspørselen av laks på verdensmarkedet er stor, men tilbudet begrenset. Potensialet for vekst hemmes av lakselus-problematikken og høy dødelighet, da ofte som følge av “hardføre” avlusningsmetoder. En effektiv og skånsom avlusning har potensiale til å åpne opp for nye konsesjoner samt redusere et registrert svinn på 15.5% (Brun *et al.*, 2022), dette i en 71 milliarders næring (Statistisk sentralbyrå, 2020).

## 1.1 Lakselus

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en ektoparasitt. Den lever på overflaten til verten, altså på huden til laksen. Parasitten spiser slim, hud og blod på verten som kan sitte igjen med betydelige sår. Dette kan videre gjøre fisken mer mottakelig for infeksjoner samt skape problematikk rundt saltbalanse (Veterinærinstituttet, no date).

Lakselusen har 8 livsstadier (Figur 1), hvorav de tre første er frittlevende. Her flyter lakselusen fritt i vannmassene. Copepoditten (stadium 3) er den som fester seg til laksen. Den er her svært liten, ca. 0.8mm, og er derfor vanskelig å finne. På chalimus I og II (stadium 4-5) har lakselusen festet seg til verten og omtales derfor som fastsittende stadier. Preadult I, II, og adult er de tre siste livsstadier (stadium 6-8). Her beveger lakselusen seg rundt på huden til laksen. På adult-stadiet kan lusen pare og reproducere seg. De adulte hunnene produserer parvis med egg-sekker som hver kan inneholde mellom 150 til 400 egg. Frem til eggene klekkes og frigis til de frie vannmasser, er de festet i lange sekker på hunnen (Dalvin, 2020).



**Figur 1** – Lakselusens livsstadier (Dalvin, 2020).

Over de siste tiårene er det registrert en jevnt økende forekomst av lusa i takt med økende biomasse. Parasitten presser laksenæringens profittmarginer, muligheten til å opprettholde god fiskevelferd og ivareta økosystemer. Ved et vesentlig lusepåslag vil laksen pådras fysiske skader samt vise tegn til stress (Veterinærinstituttet, no date). Kombinasjonen svekker immunforsvaret, øker dødeligheten og reduserer kvaliteten på sluttproduktet (Brun *et al.*, 2022).

Lusens overlevelses- og reproduksjonsevne reduseres ved fraværet av en vert (Øvergård and Hamre, 2020). Svakheten utnyttes ved avlusning, men også proaktivt gjennom brakklegging og bruk av trafikklyssystemet. Trafikklyssystemet deler opp kysten i ulike soner og regulerer produksjonsvolumet i forhold til lusepåslaget. Systemet bygger på samarbeid mellom ulike institusjoner for å regulere regioner. Havforskningsinstituttet koordinerer overvåkning, forskning og rådgivning. Dataen tolkes av en ekspertgruppe og regionale rapporter lages. Rapporten tolkes igjen av en styringsgruppe som rådgiver Nærings- og Fiskeridepartementet. Summen gir et grønt, gult eller rødt lys som betegner en tillat økning eller senkning i biomasse (Fagerbakke, 2020). Det er en rekke ulike praksiser for å holde lusetall nede. Forebyggende metoder skal begrense påslag av lakselus. Dette kan være bruk av luseskjørt eller holde laksen

på et lavere sjikt. Når lusepåslaget overstiger et visst nivå, må anlegget ta i bruk avlusningsmetoder (Pettersen, 2021).

## 1.2 Avlusningsmetoder

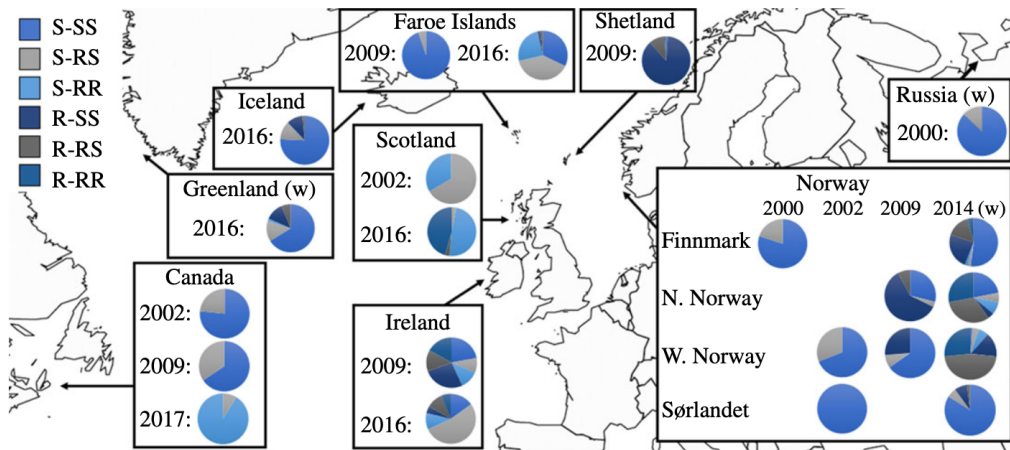
Flere behandlingsmetoder mot lusen har blitt tatt i bruk. Med unntak av ferskvannsbad kan behandlingene deles inn i gruppene termisk, mekanisk og kjemisk.

Ferskvannsbad vil foregå i en brønnbåt hvor fisken vil ligge mellom 4 og 8 timer. Laks er en anadrom art og vil ikke ta skade. Lusen vil derimot få forstyrret sin osmotiske balanse og dø. Resultatet vil variere mellom lusens livsstadier med en høy effekt på copepoditter, og en lavere hos preadulte og kjønnsmodne (Berg, 2017). Ferskvannsbad skjer gjerne i kombinasjon med høyere temperaturer og kan da gå under termisk avlusning.

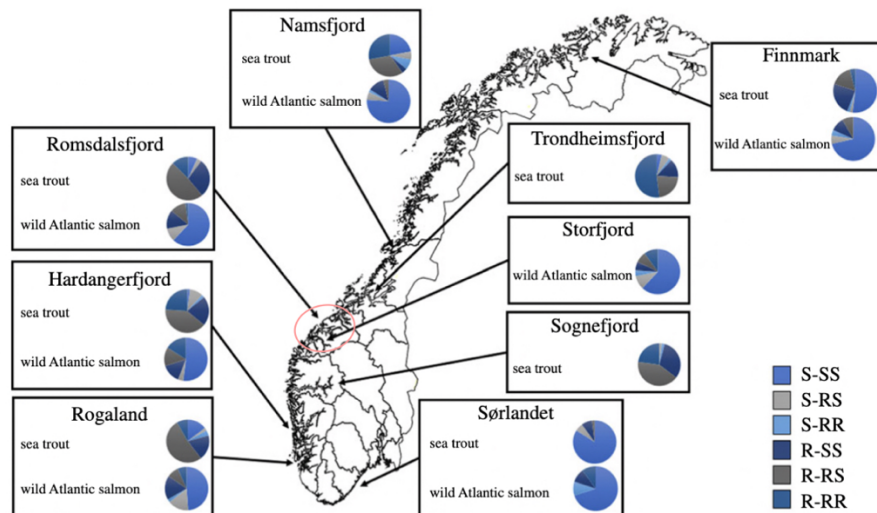
Termisk behandling utnytter laksen og lusas ulike varmeterskel. Atlantisk laks trives best i 8-14°C. På nedre sikt observeres en langsom vekst, før den så maksimeres på 13°C. Over 16°C gir laksen stressignaler (Gjerdrum, 2020). Mot 34°C vil overlevelsen være svært begrenset og alt over 28°C regnes som dårlig dyrevelferd (Nilsson *et al.*, 2019). Lakselusen trives best på samme nivåer som laksen, men vil i det øvre sjiktet bli lammet og slippe verten. Det brukes i dag to ulike metoder. Optilicier benytter et åpent vannbad med temperert vann mens Thermolicer er et gjennomstrømningssystem. Behandlingene anses å være mellom 90% og 100% effektive, men medfører dårlig fiskevelferd (Poppe *et al.*, 2018). Mekanisk avlusning omfatter fysisk fjerning av lus på laksen. SkaMik, Hydrolicer og Flatsunds Caligus er slike systemer. SkaMik benytter spylekammer og børster, mens Hydrolicer og Flatsund trykkspyling. Metodene anses som relativt hardhendte hvor fiskevelferden reduseres. Trengsel, skjelltap og gjelleblødning gir en merkbar dødelighet i etterkant av behandling (Gismervik *et al.*, 2017). Kjemisk avlusning omfatter all bruk av kjemisk fremstilte medikamenter i havbruk med mål om å fjerne lus. Fra sent 90-tallet til i dag har en rekke medikamenter blitt utviklet. Medikamentene kan gis gjennom bad i brønnbåt, en til dels lukket merd eller gjennom fôr. Gjennomgående for alle er en god, men så avtagende effekt. Dette skyldes resistens (Aaen *et al.*, 2015).

### 1.3 Resistensutvikling

Kontrollerte laboratorieforsøk og prøvetakning i Nord-Atlanteren har vist fremvekst av multiresistent lakselus. Undersøkelsene omfatter hovedsakelig lus fra oppdrettslaks hvor kjemisk behandling har blitt utført, men også fra villaks og sjørøret i områder med fravær av kjemisk behandling (Figur 2, Figur 3) (Fjørtoft *et al.*, 2021).

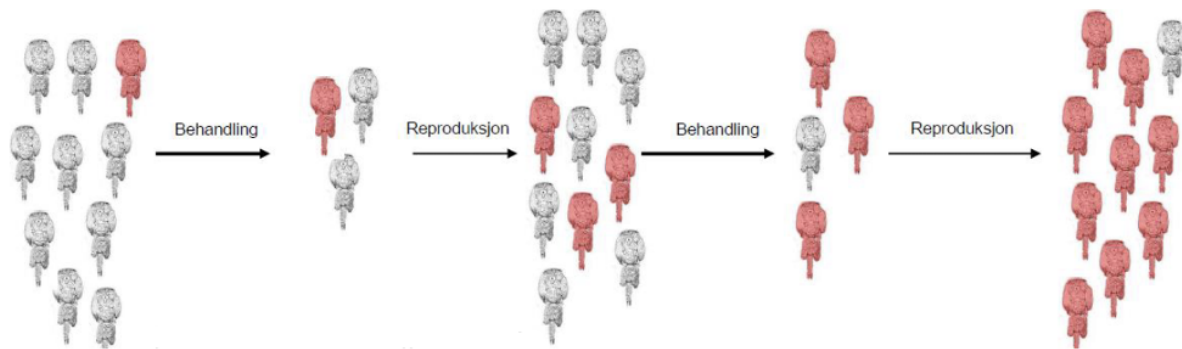


**Figur 2** – Hyppighet av resistens og sensitivitet for pyretroider og organofosfat i Nord-Atlanteren. Analyser fra 2000-2017. Organofosfat-resistens er markert med RS eller RR, pyretroid-resistens med R, multiresistens med R-RR eller R-RS og sensitiv med S eller SS (Fjørtoft *et al.*, 2021).



**Figur 3** – Resistens hos lakselus i Storfjorden og Romsdalsfjorden. Multiresistent lus har genotypene R-RR eller R-RS mens fullt sensitive lus har S-SS. Lus som er resistent mot kun organofosfat er markert med S-RR eller S-RS, mens kun pyretroid-resistens er markert med R-SS (Fjørtoft *et al.*, 2021).

Uansett behandlingsform er muligheten for enkeltindividers overlevelse til stede. Avlusning gir et seleksjonstrykk hvor gunstige mutasjoner premieres. Som vist i Figur 4, kan et individ sine gener tyngre en hel populasjon. Dersom rødt individ overlever en behandling, vil det bidra med overproporsjonalt mange avkom inn i populasjonen. Følsomheten og resistens i populasjonen vil så endres (Havforskningsinstituttet, 2018).



**Figur 4** – Illustrert av Kari O. Helgesen. Resistensutvikling i populasjon som følge av seleksjonstrykk. Sensitivt tegnet som grå, resistent som rød (Fjørtoft, no date).

Hvis en behandling har en merkbar redusert effekt, omtales populasjonen med nedsatt følsomhet. Ved nedsatt følsomhet vil det gitte nivået av kjemikalier for en effektiv behandling øke. Når effekten er borte, brukes begrepet resistens. Det er vanlig at en populasjon viser nedsatt følsomhet før den oppnår resistens (Havforskningsinstituttet, 2018).

Det kan trekkes parallell til behandling av bakterier med antibiotikum. Nye resistente grupper oppdages daglig hvor kommersielt utbredt antibiotikum ikke lenger fungerer. Leger vil så bruke nyere, mindre utbredte typer til behandling, men etter hvert vil også denne effekten avta. Utviklingen av nye antibiotikum vil ikke kunne holde tempoet til bakteriers mutasjoner (Aslam *et al.*, 2018).

I likhet med antibiotikum blir kjemisk behandling mindre og mindre effektivt til det til slutt oppstår resistens. Nye medikamenter tas i bruk, men syklusen gjentas. I tilfeller med resistens mot to eller flere behandlingstyper, omtales populasjonen som multiresistent. Ettersom få kjemiske behandlingsformer er godkjent i Norge vil det ikke være mulig å opprettholde en variert bruk av midler eller lengre pauser uten bruk. Dette kunne forebygget resistens mot et enkelt middel (Aslam *et al.*, 2018).

Organofosfat, pyretroid, hydrogenperoksid og emamectin benzoate, er de fire mest omsatte virkestoffene innen kjemisk behandling. Før dagens intensive havbruk var lusesesongen

avgrenset til sommer- og høstmånedene ettersom laksen da befant seg til havs eller i ferskvann. Havbruk har derimot gitt lus verter året rundt. Påslaget er fortsatt størst i mai måned, men dette er avhengig av produksjonsvolum, bruk av avlusning og havtemperatur (Karlsen *et al.*, 2020). Tilstedeværelsen har vokst eksponentielt med utbredelsen av havbruk, og med det utvikling av behandlingsmetoder (Fjørtoft *et al.*, 2021). Først ut var ulike former for organofosfat, men med en økende resistens ble medikamentet ineffektivt. Neste på banen var pyretroider som igjen ble erstattet av hydrogenperoksid. I 1999 tok emamectin benzoate delvis over og ble bransjestandard i en periode. Lite overraskende skulle historien gjentas, og det tok ikke lang tid før emamectin benzoate også mistet sin effekt. Når verktøykassen er tom, blir tidligere stoffer gjeninnført (Fjørtoft *et al.*, 2021). Tabell 1 viser oversikt over kjemikalier med omsetting fra 2008 til 2017, og en bruk som går i sykluser.

**Tabell 1** – Midler brukt i kjemisk avlusning perioden 2008-2017. Kilo aktiv substans (*Legemiddelbruk i oppdrettsnæringen*, 2018).

Lusemiddel	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Azametifos	66	1884	3346	2437	4059	3037	4630	3904	1269	204
Cypermethrin	32	88	107	48	232	211	162	85	48	8
Deltamethrin	39	62	61	54	121	136	158	115	43	14
Diflubenzuron	-	1413	1839	704	1611	3264	5016	5896	4824	1803
Emamectin	81	41	22	105	36	51	172	259	232	128
Teflubenzuron		2028	1080	26	751	1704	2674	2509	4209	293
Hydrogenperoksid		308	3071	3144	2538	8262	31577	43246	26597	9277

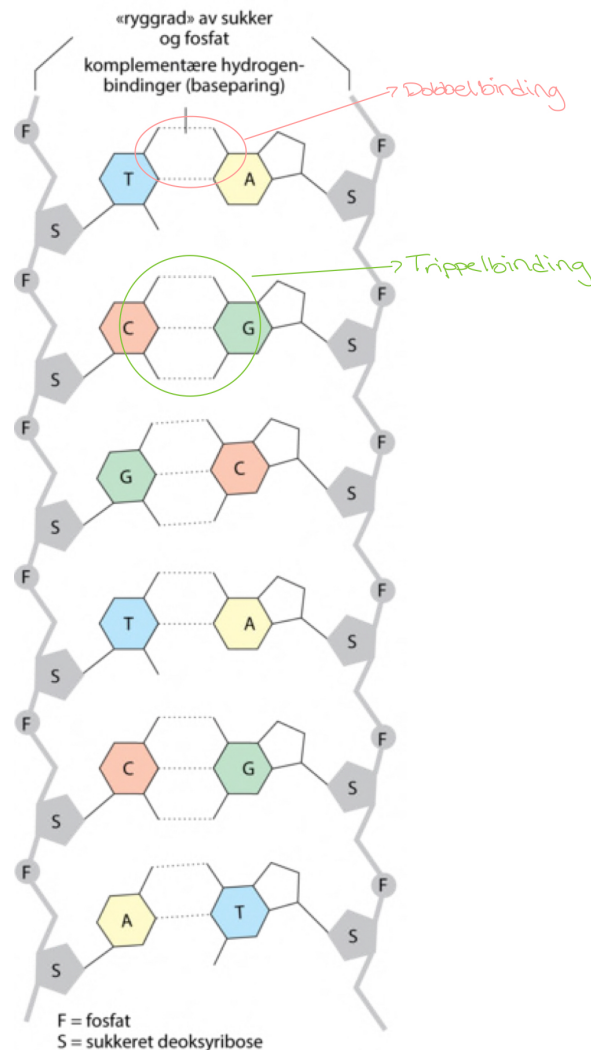
Del av tabell som er markert i grått er før start av legemiddelkampanjen.

Hydrogenperoksid brukes i bad på brønnbåt. Tidligere har middelet blitt sluppet i havet etter bruk, men praksisen har vist seg å ha en rekke ringvirkninger på økosystemet. Mest utbredt er formeringsdefekter hos reker og andre krepsdyr. Hydrogenperoksid har også en betydelig dødelighet hos laks og undersøkelser viser tilfeller av resistensutvikling hos lusen, hvorav nedsatt følsomhet er hyppigst (Helgesen *et al.*, 2017).

Emamectin benzoate benyttes gjennom fôr. Bruken i antall kilo emamectin benzoate økte betydelig fra 1999-2008, og igjen fra 2014-, (Vedlegg 1). Lusens økende motstandsdyktighet er en betydelig faktor. Det er manglende forskning på området og det er ikke fastsatt hvor mange gener som er involvert i resistensutviklingen (Helgesen, Jansen and Horsberg, 2018).

Resistens mot pyretroider kan ha ulike opphav. Mest kjent er *kdr*-mutasjonen, men denne er ikke funnet i Norge. Det er derimot registrert en mutasjon i Norge som gir økt metabolsk kapasitet og en endring i spenningsavhengige natriumkanaler. Slike natriumkanaler er

pyretroiders virkested, og det kan tenkes at en endring i aminosyrens elektrokjemiske egenskaper hemmer virkningsgraden (Boxaspen *et al.*, 2017). Figur 5 illustrerer en dobbel heliks bygd opp fire forskjellige nukleotidkjeder. Nukleotidkjedene består av et sukker- og fosfatmolekyl samt en base.



**Figur 5** – DNA-struktur (Langdalen, 2020). Mutasjon er varige endringer i baserekkefølgen i DNA-et. Adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og tymin (T) bygger opp de ulike baseparene. Er igjen bundet sammen av dobbel eller trippel hydrogenbinding.

Mutasjon for resistens mot pyretroid illustreres med at normalvarianten *cytB* (det sensitive genet), Cytosin (C), blir byttet ut med Tymin (T). Dobbel hydrogenbinding i resistant gen skilles ved 77°C. Trippel hydrogenbinding i sensitivt gen skilles ved 77.5°C.

### Gen med mutasjon for resistens

TTCTTACAGACAAAGCTAAAGCCACTACCCCCC**T**AACTTATTTGGGATAGACCG  
CAAATAGCATAAGCAAACAAAAAATACCATTCAGGTTGAATGTGAGCAGGAGT  
TACT

### Gen for sensitivitet

TTCTTACAGACAAAGCTAAAGCCACTACCCCCC**C**AACTTATTTGGGATAGACCGC  
AAAATAGCATAAGCAAACAAAAAATACCATTCAGGTTGAATGTGAGCAGGAGTT  
ACT

Av tre kommersielt brukte organofosfat (metrifonat, diklorvos og azametifos) er det kun azametifos som fortsatt er godkjent for bruk. Behandlingen foregår i form av bad med hel eller delvis tildekket merd. Middelet tas opp gjennom lusens gjeller og hydrofobe kitinlag, men også gjellene til laksen. Etter å ha spredt seg i vev og celler vil organofosfatet virke enzymhemmende. Ved en hemming av enzymet acetylkolinesterase (AChE) vil nedbryting av transmittorsubstansen acetylkolin hindres, organisme overstimuleres og reseptorer blokkeres. Etersom virkningen er irreversibel, vil en regenerering kreve dannelse av nye enzymer. Midlene trenger raskere inn i lusen enn fisken som også evner en raskere metabolisme. Jo raskere metabolisme, desto raskere vil midlene bli omsatt til inaktive produkter. Forutsetningene gir en ulik dødsrate på 5% mot 95% hos lakselus (Bredal, Vågen and Reinnel, 2000). Resterende lus omfatter i hovedsak yngre fastsittende chalimus-stadier der virkningsgraden er lav (25%) (Bredal, Vågen and Reinnel, 2000).

Mutasjonen for organofosfat-resistens illustreres med en baseendring til A. Den mest vanlige organofosfat-resistensen er missense-mutasjon *Phe362Tyr* i genet *ace1a* (Kaur *et al.*, 2015). For det sensitive genet, vil basen som blir byttet ut ved resistens være T. Den doble hydrogenbindingen skiller ved 72.5°C ved resistens og 73°C for sensitiv.

### Gen med mutasjon for resistens

ATTTTAATTGGAGCGAATAAGGAAGAAGGGAATTATT**A**CATCATGTACTATCTTA  
CAGATCTCTTTAAAAATACGGAGAGCG

### Gen for sensitivitet

ATTTTAATTGGAGCGAATAAGGAAGAAGGGAATTATT**T**CATCATGTACTATCTTA  
CAGATCTCTTTAAAAATACGGAGAGCG



For å unngå utvikling av multiresistens eller utslakting som følge av et gjentakende luseproblem, skjer det en betydelig økt investering innen forebyggende metoder.

Forebyggende metoder som rensefisk kan mulig holde bestanden til en viss grad stabil. Dette forutsatt rette forhold og moderate mengder lus (Mæland, 2020). Enkelte selskaper forsøker også å endre de abiotiske forholdene. Dette omfatter eksempelvis snorkelmerder hvor laksen holdes under det øverste vannlaget, og havmerder hvor anlegget flyttes ut av fjordene til mer værkrevene områder hvor lusepåslaget potensielt kan reduseres.

Analysert lakselus kommer fra Dryna og Gudmundset i Midfjorden og Storfjorden. Pyreotridet deltamethrin ble sist brukt på Gudmundset i 2016 (Storfjorden) og Dryna i 2014 (Midfjorden). Organofosfatet azamethiphos ble sist brukt på Dryna i 2014, men så sent som i 2021 på Gudmundset (Figur 11). Proaktive metoder og mekanisk avlusning er nå mest utbredt, men det er likevel av interesse å undersøke tilstedeværelsen av ulike resistente gen. Hvis et gen ligger latent, kan en mulig resistens raskt vende tilbake ved ny bruk (Moody and Basten, 1990).

#### **1.4 Analysemetoder for studier av resistensutvikling hos lakselus**

Bioassay er mye brukt for kartlegging av resistensutvikling. Metoden baserer seg på eksponering av levende lakselus for utvalgte kjemikalier for å så registrere overlevelse (Kierulf, 2018). I nyere tid har en metode som benytter de aktuelle mål-gen med mutasjoner som prinsipp delvis tatt over.

Real-time PCR (polymerasekjedereaksjon), eller qPCR, er en metode for PCR-analyse. Dette er en kvantitativ metode i motsetning til PCR som er en kvalitativ metode. qPCR kan selektivt kopiere opp et målgen hvor det antas å ha mutasjonen for resistens (Fossum and Dissen, 2021). I qPCR blir det ofte brukt et fluorescerende fargestoff, SYBR Green Dye i amplifikasjonsprosessen som binder seg til dobbelstreng DNA. PCR-metoden amplifiserer målgen, noe som gjør at fluorescensen øker med mengden målgen som kopieres. SYBR Green fargen fører også til at man kan gjennomføre smeltepunktanalyse som viser hvor lang tid det tar for nukleotidpar å skille seg. Nukleotider er bundet med 2 eller 3 hydrogenbindinger og en smeltepunktsskurve kan si noe om sammensetningen av målgen. Variant av gen splittes ved X grader, mens et gen med mutasjon splittes ved Y grader. Smeltepunktanalysen gjør det mulig å sammenligne sekvensen til målgen med hverandre. En alternativ metode for å markere mutasjon er bruk av qPCR med TaqMan-probe. Metoden bruker prober for å detektere akkumulert DNA (Thermo Fisher, 2014).

## 1.5 Problemstilling

Resistens mot kjemiske avlusningsmidler er en vesentlig utfordring for næringen. Mekaniske avlusningsmetoder har erstattet en tidvis stor kjemikalbruk, men med en høy dødelighet. Fra 2008-2009 økte innrapporteringen av antall ineffektive kjemiske avlusninger. I 2013 kom Mattilsynets overvåkningsprogram for å følge utviklingen av resistens samt hyppighet av behandling. Studiene har vist en økt forekomst av resistens hos lakselus i perioder med økt bruk av kjemiske behandlinger (Aaen *et al.*, 2015). De siste årene har det derimot skjedd en nedgang. Det kan antas at den reduserte bruken av kjemisk avlusning kan bidra til å hindre videre spredning av resistensgener og dermed en lavere frekvens av resistens blant lakselus.

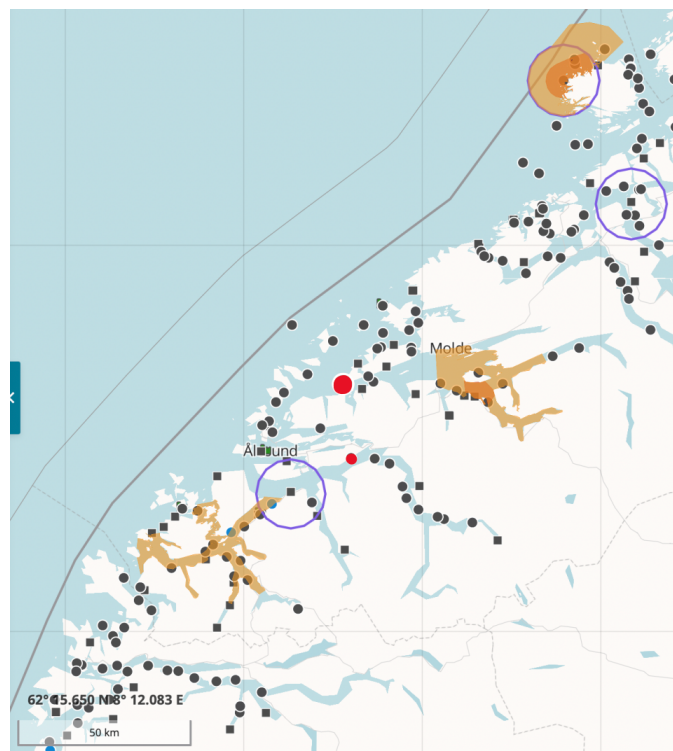
For å undersøke dette har vi i denne oppgaven valgt å analysere 36 lakselus fra to lokaliteter, for pyretroid- og organofosfat-resistens.

Oppgaven sikter på å studere om ulike populasjoner i fjordene vil bære en genetisk mutasjon for pyretroider og/eller organofosfat. Statistisk sett vil en gjeninnføring av kjemisk behandling i et område med tidligere resistens vise seg ineffektiv selv med flere år uten. Om dette derimot gjelder etter 8 år er uvisst (Havforskningsinstituttet, 2018).

## 2. Material og Metode

### 2.1 Prøvemateriale

Lakselus ble samlet under telling av laks i utkanten av Midfjorden (Dryna) og midten av Storfjorden (Gudmundset), se Figur 6. Laksen ble lokket med fôr og fanget av en liten kastnot. Lakselus ble bevart i RNAlater og fraktet til laboratoriet for analyse. Tiden fra fangst til lab tok 1-2 dager, hvorav 2 timer var transport. Lakselus ble transportert ved utendørstemperatur til Campus. All videre oppbevaring foregikk på kjølerom. Isolert DNA ble fryst.



**Figur 6** – Kart over de to lokalitetene. Dryna er markert med en større rød sirkel, øverst, mens Gudmundset med en mindre rød sirkel, øst for Ålesund (BarentsWatch, 2022).

### 2.2 DNA-isolering

DNA fra lakselus ble isolert ved bruk av DNeasy blood and Tissue kit fra Qiagen. 20  $\mu$ l proteinase K og 180  $\mu$ l Buffer ATL ble pipettert over i et individuelt eppendorfrør. Lus ble skjært i vevsbiter på 0.5 x 0.5 cm ved hjelp av steril skalpell og plassert i individuelle eppendorfrør. Skalpell ble byttet ut mellom hver lus og pinsett desinfisert for å unngå kontaminasjon. Hver prøve ble markert med tall og bokstav. Dag 1 med 1A, 1B, 1C..., dag 2 med 2A, 2B, 2C... Prøver av lus fra Sognefjorden med en 90% pyretroidresistens ble brukt som kontroll og markert med K1, K2, K3 og K4.

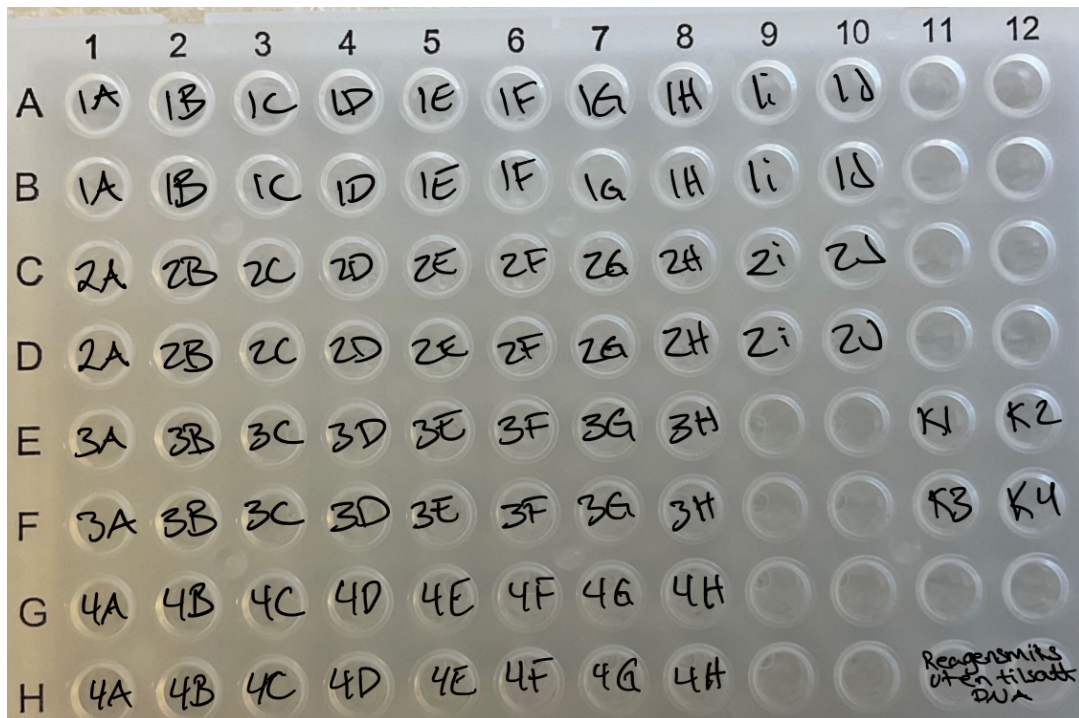
Prøvene ble inkubert i en VWR Digital Heatblock på 56°C i 60 minutter for å løse opp vevet og lysere cellene. Hvert 15 minutt ble rør ristet på vortex. Etter inkubering ble 200 µl Buffer AL ble tilsatt eppendorfrørene og rør ble mikset på vortex før inkubasjon på 70°C i 10 min. 200 µl etanol (96% EtOH) ble pipettert over i eppendorfrørene, blandet på vortex og overført til spinnkolonne med silica-membran som har affinitet for DNA.

Blanding i eppendorfrør ble pipettert over i DNeasy mini spin column og sentrifugert på 8000 rpm (rounds per minute), i 1 minutt. Sentrifugering binder DNA til DNeasy-membranen mens kontaminanter passerer gjennom. Vask utføres for å rense DNA-et for gjenværende kontaminanter slik at en sitter igjen med rent DNA.

DNeasy mini spin column ble plassert i et nytt samlerør og tilsatt 500 µl AW1 (vaskebuffer). Prøvene ble på nytt sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt før DNeasy mini spin column igjen ble plassert i nye samlerør. 500 µl AW2 ble tilsatt og prøvene sentrifugert på 14000 rpm i 3 minutter. AW1 og AW2 sikrer at de kontaminantene som ikke har blitt skylt gjennom membranen så langt i prosessen forsvinner, og at det kun er DNA som sitter igjen på membranen. DNeasy mini spin column ble plassert i eppendorfrør og er nå klar til eluering. 100 µl elueringsbuffer (Buffer AE) ble tilsatt direkte på DNeasy-membranen. Prøven ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt før den ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Prosessen ble gjentatt på nytt, men med 50 µl Buffer AE for at DNA-et skulle bli vasket ut fra DNeasy-membranen og ende opp i eppendorfrøret.

### **2.3 qPCR/Real-time PCR**

qPCR ble utført, ett assay for pyretroid og et for organofosfat. Det ble pipettert ut 13 µl av reaksjonsmiksen bestående av SYBR Green Dye, primer spesifikt for de ulike målgenene og polymerase, og 2 µl DNA over i en PCR-plate. Prøvene ble lagt i paralleller, i tillegg ble det laget to referanseprøver som kun bestod av reaksjonsmiks, samt fire kontrollprøver med 90% pyretroid-resistent lakselus (Figur 7). En plastfilm ble brukt til å forsegle platen, og qPCR-maskinen ble innstilt på 95°C i 3 min og deretter 40 sykluser med 95°C i 20 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C i 30 sekunder før smeltepunktanalyse ble utført. En referansefarge, ROX, ble lagt til for å normalisere prøver mellom to brønner og gjorde at prøvene ble sammenlignbare med hverandre. PCR-platen ble lagt i maskinen og analysen ble utført.



**Figur 7** – Figuren viser hvor på PCR-platen ulike prøver ble plassert. K1, K2, K3 og K4 viser hvor kontrollprøvene ble lagt, altså fra 90% pyretroid-resistent laks. Reagensmikst uten DNA ble plassert i brønnene H11 og H12 for kontroll, mens DNA-prøvene ble lagt i paralleller.

A1 Gudmundset	A2 Gudmundset	A3 Gudmundset	A4 Gudmundset	A5 Gudmundset	A6 Gudmundset	A7 Gudmundset	A8 Gudmundset	A9 Gudmundset	A10 Gudmundset	A11	A12
B1 Gudmundset	B2 Gudmundset	B3 Gudmundset	B4 Gudmundset	B5 Gudmundset	B6 Gudmundset	B7 Gudmundset	B8 Gudmundset	B9 Gudmundset	B10 Gudmundset		
C1 Dryna	C2 Dryna	C3 Dryna	C4 Dryna	C5 Dryna	C6 Dryna	C7 Dryna	C8 Dryna	C9 Dryna	C10 Dryna		
D1 Dryna	D2 Dryna	D3 Dryna	D4 Dryna	D5 Dryna	D6 Dryna	D7 Dryna	D8 Dryna	D9 Dryna	D10 Dryna		
E1 Dryna	E2 Dryna	E3 Dryna	E4 Dryna	E5 Dryna	E6 Dryna	E7 Dryna	E8 Dryna			E11 Sognefjorden	E12 Sognefjorden
F1 Dryna	F2 Dryna	F3 Dryna	F4 Dryna	F5 Dryna	F6 Dryna	F7 Dryna	F8 Dryna			F11 Sognefjorden	F12 Sognefjorden
G1 Dryna	G2 Dryna	G3 Dryna	G4 Dryna	G5 Dryna	G6 Dryna	G7 Dryna	G8 Dryna				
H1 Dryna	H2 Dryna	H3 Dryna	H4 Dryna	H5 Dryna	H6 Dryna	H7 Dryna	H8 Dryna			H11 Reagensmikst uten DNA	H12 Reagensmikst uten DNA

**Figur 8** – Viser oversikt over analyser utført. Ti prøver kommer fra Gudmundset og er lagt i paralleller. Dette er de to øverste rekkene, altså A1-A10 og B1-B10. Resterende prøver er samlet fra anlegget på Dryna og dette gjelder da 26 prøver. Også disse prøvene ble lagt i paralleller, og en finner disse på de 6 nederste radene. Fra C1-C10 og ned til H1-H8. Prøver fra Sognefjorden som tidligere har vært analysert ble benyttet som kontroller.

### 3. Resultat

Av totalt 36 prøver var henholdsvis 15 og 16 prøver resistent og sensitiv mot pyretroid (Tabell 2). Dette tilsvarer en prosentandel på 42% resistente og 44% sensitive av alle prøver. Én prøve fikk intet prøvesvar i begge parallellene. 4 prøver får resultat som er inkonklusive.

Av totalt 36 prøver var 10 fra Gudmundset og 26 fra Dryna. Gudmundset fikk et resultat på 6 resistente og 4 sensitive prøver. Dryna viste 9 resistente, 12 sensitive, 4 inkonklusive og 1 prøve uten prøvesvar.

**Tabell 2** - Resultater fra pyretroid qPCR. Prøvene ligger i paralleller med én referanse og én kontroll. DNA fra 1A er plassert i både brønn A1 og B1, DNA fra prøve 1B i A2 og B2, fra prøve 2A i brønn C1 og D1 etc.. De gule feltene, K1, K2, K3 og K4, er kontrollprøver fra lus som er 90% pyretroid-resistent.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
13,33	13,44	12,53	12,43	13,6	13,25	13,51	13,3	13,83	13,46		
77	77,5	77	77,5	77	77	77	77,5	77,5	77		
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10		
13,29	13,29	12,6	12,87	13,9	13,47	13,38	13,3	14,04	13,84		
77	77,5	77	77,5	77	77	77	77,5	77,5	77		
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10		
13,58	11,6	11,4	11,23	12,82	25,32	26	12,01	11,5	12,28		
77,5	77,5	77	77,5	77	68	77	77,5	77,5	77		
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10		
11,5	11,98	11,37	26,45	13,58	11,08	11,16	11,62	10,32	12,4		
77,5	77,5	77	77,5	76,5	77	77	77,5	77,5	77		
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8			E11	E12
13,39	12,46	14,12	14,91	16,28	14,26	14,95	12,3			K1	K2
77	77	77,5	77,5	77	77	77	77,5				
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8			F11	F12
13,35	12,45	25,84	14,38	13,99	15,01	14,92	12,14			K3	K4
77	77	77,5	77,5	76,5	77	77	77,5				
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8				
12,13	13,04	12,81	14,56	13,34	25,09	13,69	13,65				
77,5	77,5	77,5	76,5	77	68	77,5	77				
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8			H11	H12
12,48	12,84	13,2	13,36	13,03	12,88	20,38	12,98			Reagensmiks uten DNA	Reagensmiks uten DNA
77,5	77,5	77,5	77	77	76,5	77,5	77				

**Tabell 3** - Kontrollprøver uten DNA (blå), resistens (rød), sensitiv (grønn). Smeltepunktet for mutasjonsgenet som er resistent er på 72.5°C. For normalvarianten av genet, det sensitive genet, har et smeltepunkt på 73C. Ct-verdier ligger mellom 17.59 og 18.36.

Standard Resistent	17,9	77
Standard Resistent	18,36	77
Standard Sensitiv	17,59	77,5
Standard Sensitiv	17,62	77,5
No template control	No Cq	-
No template control	No Cq	-

Resultatene for organofosfat blir ført som trolig sensitiv eller trolig resistent, noe som kan skyldes usikkerhet knyttet opp mot selve analyse-metoden (Tabell 5). qPCR for organofosfat var altså mindre sikre, men antyder at 2 paralleller er resistente og 20 sensitive. Analysen viser 14 paralleller med tvetydig utslag (Tabell 4).

Av 10 prøver fra Gudmundset var 1 prøve resistent, 6 sensitive og 3 inkonklusive. Av 26 prøver fra Dryna var 1 resistent, 14 sensitive og 11 inkonklusive (Tabell 4).

**Tabell 4** - Resultater fra qPCR for organofosfat. Prøvene ble lagt i paralleller. Én referanse og én kontroll. Gult felt, K1, K2, K3 og K4, er kontrollprøver fra Sognefjorden med 90% pyretroid-resistens.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
16,81	19,1	17,14	16	17,89	18,14	17,36	17,24	18,27	17,52		
73	73	73	73,5	72,5	73	73	73	73	73		
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10		
16,5	17,55	17,11	16,53	17,29	18,23	17,77	17,45	18,32	17,48		
73	73,5	73	73	72,5	73	72,5	73	73	73		
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10		
16,78	15,72	14,97	16,34	15,22	14,85	14,08	14,94	16,27	15,1		
73	73	72,5	73	73	73	73	73	73,5	73		
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10		
15,71	16,32	14,88	16,28	15,72	15,51	No Cq	15,61	15,92	15,32		
73	73	72,5	73	73	73	-	73	73	73		
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8			E11	E12
17,45	17,65	18,09	18,45	16,65	17,45	19,16	16,3			K1	K2
73	73	73	73	73	73	73	73				
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8			F11	F12
17,41	17,55	18,36	18,07	17,47	17,4	19,27	16,54			K3	K4
73	73	72,5	72,5	73	73	73	72,5				
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8				
16,6	17,5	17,15	16,41	15,86	16,64	17,73	17,42				
73	73	72,5	72,5	73	73	72,5	73				
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8			H11	H12
16,11	15,95	17,07	16,36	16,59	16,92	17,57	17,44			Reagensmiks uten DNA	Reagensmiks uten DNA
73	73,5	73,5	73	73,5	73,5	73	73				

**Tabell 5** – Kontrollprøver uten DNA (blå), sannsynlig resistent (rød), sannsynlig sensitiv (grønn). Sannsynlig resistent har et smeltepunkt på 72.5°C, sannsynlig sensitiv på 73°C. Ct-verdier mellom 19.39 og 22.34.

No template control	No Cq	-
No template control	No Cq	-
Most likely sensitive	22,34	73
Most likely sensitive	20,31	73
Most likely resistant	19,39	72,5
Most likely resistant	20,82	72,5

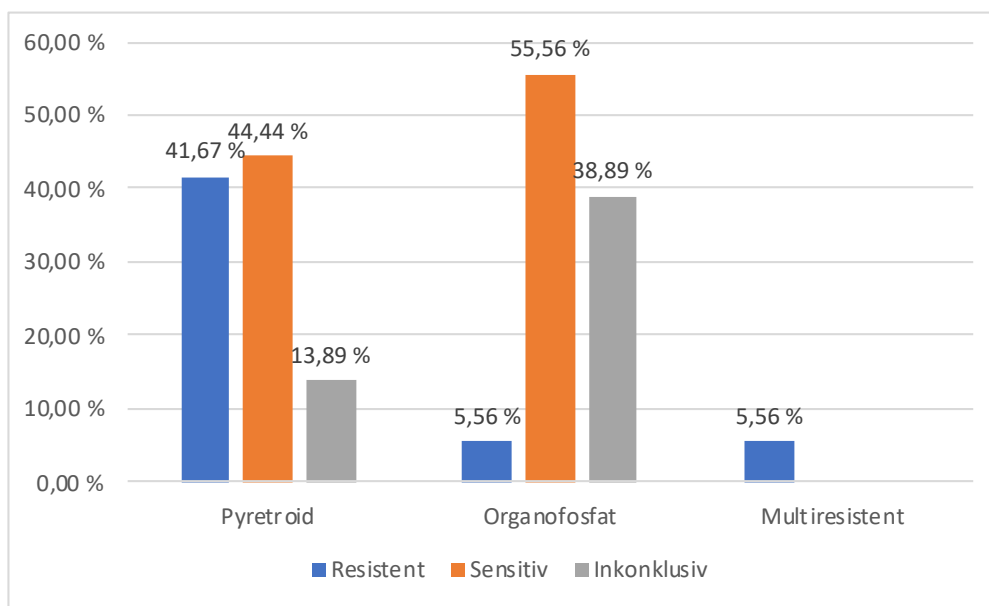
I analysen for sensitivitet og resistens mot pyretroider har 15 paralleller prøvesvar som tilsvarer resistent referanse- og kontrollprøve. 6 av disse er igjen fra Gudmundset og 9 fra Dryna. Videre har 16 paralleller prøvesvar som tilsvarer prøvesvar fra en sensitiv referanse- og sensitiv kontrollprøve. 4 lus er her fra Gudmundset og 12 fra Dryna. Det er ikke registrert noen resultater uten prøvesvar fra Gudmundset, men Dryna har 1 prøve uten svar. Videre for Dryna viser analysen at parallell A5 og B5 (Tabell 6) er resistent mot pyretroid og mest sannsynlig sensitiv for organofosfat. Analysen fra Dryna viser at fem paralleller trolig er sensitive for både organofosfat og pyretroid, mens kun én viser trolig resistens for begge kjemikaliene. Parallell C3 og D3 er mest sannsynlig resistent.

**Tabell 6** - Resultater fra både pyretroid og organofosfat. 2 prøver er resistent og 7 sensitive for begge kjemikaliene.

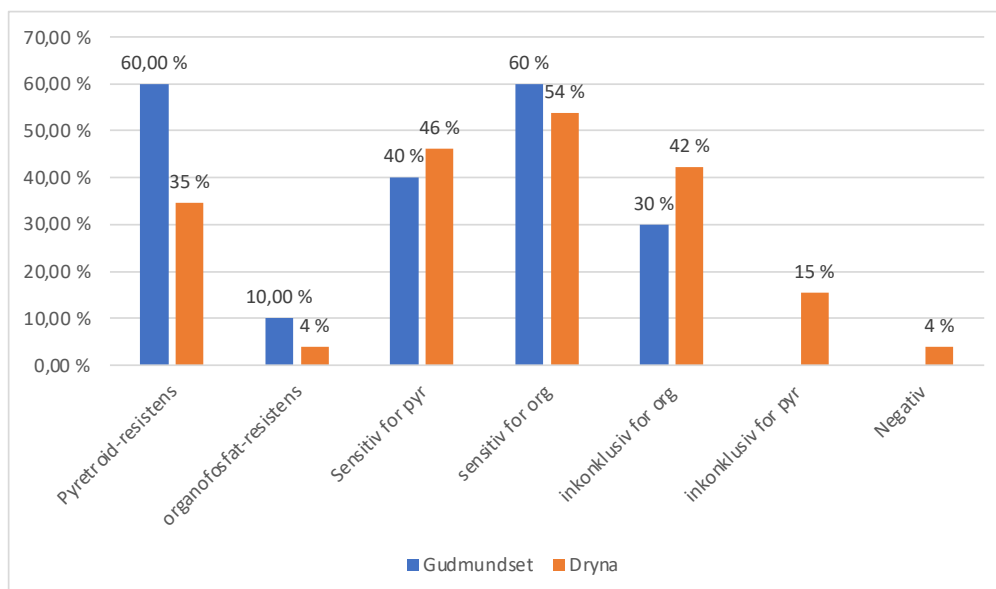
A1 Pyretroid Organofosfat	A2 Pyretroid Organofosfat	A3 Pyretroid Organofosfat	A4 Pyretroid Organofosfat	A5 Pyretroid Organofosfat	A6 Pyretroid Organofosfat	A7 Pyretroid Organofosfat	A8 Pyretroid Organofosfat	A9 Pyretroid Organofosfat	A10 Pyretroid Organofosfat	A11	A12
B1 Pyretroid Organofosfat	B2 Pyretroid Organofosfat	B3 Pyretroid Organofosfat	B4 Pyretroid Organofosfat	B5 Pyretroid Organofosfat	B6 Pyretroid Organofosfat	B7 Pyretroid Organofosfat	B8 Pyretroid Organofosfat	B9 Pyretroid Organofosfat	B10 Pyretroid Organofosfat		
C1 Pyretroid Organofosfat	C2 Pyretroid Organofosfat	C3 Pyretroid Organofosfat	C4 Pyretroid Organofosfat	C5 Pyretroid Organofosfat	C6 Pyretroid Organofosfat	C7 Pyretroid Organofosfat	C8 Pyretroid Organofosfat	C9 Pyretroid Organofosfat	C10 Pyretroid Organofosfat		
D1 Pyretroid Organofosfat	D2 Pyretroid Organofosfat	D3 Pyretroid Organofosfat	D4 Pyretroid Organofosfat	D5 Pyretroid Organofosfat	D6 Pyretroid Organofosfat	D7 Pyretroid Organofosfat	D8 Pyretroid Organofosfat	D9 Pyretroid Organofosfat	D10 Pyretroid Organofosfat		
E1 Pyretroid Organofosfat	E2 Pyretroid Organofosfat	E3 Pyretroid Organofosfat	E4 Pyretroid Organofosfat	E5 Pyretroid Organofosfat	E6 Pyretroid Organofosfat	E7 Pyretroid Organofosfat	E8 Pyretroid Organofosfat			E11 Sognefjorden	E12 Sognefjorden
F1 Pyretroid Organofosfat	F2 Pyretroid Organofosfat	F3 Pyretroid Organofosfat	F4 Pyretroid Organofosfat	F5 Pyretroid Organofosfat	F6 Pyretroid Organofosfat	F7 Pyretroid Organofosfat	F8 Pyretroid Organofosfat			F11 Sognefjorden	F12 Sognefjorden
G1 Pyretroid Organofosfat	G2 Pyretroid Organofosfat	G3 Pyretroid Organofosfat	G4 Pyretroid Organofosfat	G5 Pyretroid Organofosfat	G6 Pyretroid Organofosfat	G7 Pyretroid Organofosfat	G8 Pyretroid Organofosfat				
H1 Pyretroid Organofosfat	H2 Pyretroid Organofosfat	H3 Pyretroid Organofosfat	H4 Pyretroid Organofosfat	H5 Pyretroid Organofosfat	H6 Pyretroid Organofosfat	H7 Pyretroid Organofosfat	H8 Pyretroid Organofosfat			H11 Reagensmik uten DNA	H12 Reagensmik uten DNA

Prøvene er lagt i paralleller der smeltepunktverdien må være den samme i begge brønnene for at prøven skal kunne tolkes. Denne verdien er den vi finner i de fargede rutene i Tabell 2 og forklarer altså på hvilken temperatur de to DNA-nukleotidtrådene slipper taket fra hverandre. I analysen fra pyretroider er referanse A1 og kontroll B1 registrert med splittelse på 77°C, hvorav begge er markert grønt for resistens. Referanse C1 og kontroll D1 har registrert splittelse på 77.5°C og markeres rødt for sensitiv. Referanse C6 og kontroll D6 har ulikt resultat. C6 er svært lavt på 68°C, og dermed hverken resistent eller sensitiv. D6 ble splittet på 77°C og er resistent. Prøven har altså ulike smeltepunkt og registreres som inkonklusiv. Analysen registrerte fem slike prøver, hvorav fire enten hadde én resistent referanse/kontroll og én referanse/kontroll uten prøvesvar. Referanse G6 og kontroll H6 er den eneste parallellen med både én kontroll og referanse uten prøvesvar.





**Figur 9** – Oversikt over andel resistente og sensitive gen mot pyreteroid og organofosfat. For pyreteroider er rundt 42% resistent, 44% sensitiv og 14% inkonklusiv. For organofosfat viser diagrammet at rundt 6% er resistent, 56% sensitiv og 39% inkonklusiv. To av prøvene fra både pyreteroid og organofosfat er resistent mot begge.



**Figur 10** – Oversikt over andel resistente og sensitive gen mot pyreteroid og organofosfat på de to lokalitetene, Dryna og Gudmundset. Av 10 prøver fra Gudmundset var 60% pyreteroid-resistent, 10% organofosfat-resistent, 40% var sensitiv mot pyreteroider og 60% mot organofosfat, mens 30% var inkonklusiv. Av 26 prøver fra Dryna var 35% resistent mot pyreteroid og 4% mot organofosfat. Sensitiv for pyreteroid og organofosfat var 46% og 54%. 42% fikk et resultat som var inkonklusiv for organofosfat, mens dette var 15% for pyreteroider. 4% av prøvene fikk et negativt svar.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Kjemiske avlusningsmetoder Dryna	Deltamethrin Rensefisk	Deltamethrin Azamethiphos Hydrogenperoksid Rensefisk	Enametrin benzoat Rensefisk	Hydrogenperoksid Mekanisk fjerning	Rensefisk	Mekanisk fjerning	Mekanisk fjerning		Mekanisk fjerning	Medikamentell - annet virkestoff
Kjemiske avlusningsmetoder Gudmundset	Azamethiphos Deltamethrin Rensefisk	Deltamethrin Azamethiphos Rensefisk	Deltamethrin Azamethiphos Hydrogenperoksid Rensefisk	Hydrogenperoksid Deltamethrin Azamethiphos Rensefisk Mekanisk fjerning	Rensefisk	Mekanisk fjerning Medikamentell - annet virkestoff	Mekanisk fjerning Medikamentell - annet virkestoff	Enametrin benzoat Azamethiphos Mekanisk fjerning		Mekanisk fjerning
Utvikling resistens (Fjortoft et al., 2021)	Økende trend	Økende trend	Nedgående trend	Nedgående trend	Nedgående trend					
Matløyrens årlige rapport, konklusjon resistensnivå										
Resistens qPCR 2022 Dryna:										
Organofosfat										4 %
Pyreteroid										32 %
Resistens qPCR 2022 Gudmundset:										
Organofosfat										10 %
Pyreteroid										60 %

**Figur 11** – Kjemiske stoffer brukt under avlusning på anleggene Dryna og Gudmundset fra 2013-2022. Utvikling av resistens fra tidligere analyser samt analyseprøver fra Dryna og Gudmundset i 2022.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Virkning av behandlingsmetoder mot lakselus

Lakselus har vært problematisk for havbruksnæringen siden tidlig 90-tallet hvor de første tilfellene oppsto (Havforskningsinstituttet, 2018). Flere behandlingsmetoder er utviklet, hvorav kjemisk avlusning har vært foretrukket ((Hoddevik and Press, 2019) (Overton et al., 2019)(Gismervik *et al.*, 2019)(Fjørtoft *et al.*, 2021)). En overdreven bruk har medført resistensutvikling og derav redusert effekt av gitte kjemikalier. Resultatene fra analysen av den aktuelle undersøkelsen viser et fortsatt høyt resistensnivå for pyretroid, mens det er tegn på nedgang i resistent lakselus mot organofosfat.

Termisk og mekanisk avlusning anses som svært krevende for laksen. Høye temperaturer under termisk, og fysisk behandling under mekanisk (trenging, spyling, børsting, lufttrykk) gir tydelige stress-signaler hos laksen (Gismervik *et al.*, 2017). Tilfeller av hjertesprekk har steget i samspill med bruken av mekanisk avlusning, og med den dødeligheten (Amundsen, 2022). Dyrevelferden under termisk avlusning er såpass kritikkverdig at mattilsynet planla å forby praksisen, men gikk tilbake på sin beslutning grunnet «manglende kunnskap» (Dyrevernalliansen, 2021). Problematikken rundt kjemisk avlusning på sin side reises ikke primært på bakgrunn av fiskevelferd, men av den nedgående effekten (Havforskningsinstituttet, 2018). Studier har undersøkt bruken av kjemisk behandling og utviklingen av motstandsdyktighet ((Fjørtoft *et al.*, 2021)(Mattilsynet, 2022)). Hvis forbyggende metoder ikke er nok, og en avlusning må til for å fjerne et stort lusepåslag, vil en kjemisk metode være fordelaktig for oppdrettslaksens helse. Dødeligheten av en kjemisk behandling (14%), med organofosfat eller pyretroider, vil være halvparten av en termisk (31%) og like over halvparten av en mekanisk behandling (25%) (Overton *et al.*, 2019).

For å motvirke resistensutvikling har kartlegging av hvor og hvilke stoffer lakselus har utviklet resistens mot vært sentralt. I 2013 innførte Mattilsynet et overvåkningsprogram for å kartlegge utbredelsen av resistens blant lakselus, samt bruk av ulike avlusningsmetoder (Mattilsynet, 2022). Resultatene danner et bilde av dagens situasjon som igjen kan gi videre grunnlag for å revurdere den aktuelle bruken og/eller innføre nye kjemikalier. Det gis her imidlertid ikke noen detaljert oversikt over regionale forskjeller. Å kartlegge resistens på produksjonsområder, eller å få dokumentert en bedring i områder som deler lusepopulasjon, kan være svært fordelaktig for aktuelle beslutningstakere. Havbruk medfører økte nivåer av lakselus i fjordene, både i og utenfor sesong. Dette har stor påvirkning for blant annet villaksens vandring, smolt-fase og

dødelighet ((Mattilsynet, 2016)(Karlsen, 2019)(Karlsen *et al.*, 2020)). Villaksen er en rødlistet art, og lakselusen beregnes til å stå for om lag 10% av den årlige dødeligheten (Karlsen, 2019). Effektive avlusninger vil redusere lakselus i fjordene. Reduserte mengder lakselus vil redusere påslag på oppdrettslaks og villaks, og derav redusere dødeligheten. Kjemisk behandling er både effektiv og skånsom, så lenge resistens ikke er til stede. Vi kan i dag etter flere år uten vesentlig bruk av kjemikalier diskutere om de aktuelle lakselus-populasjonene fortsatt har gen for resistens, om genet ligger latent, eller om genet har forsvunnet helt.

Resultater fra analysene i den aktuelle studien viser en tydelig tilstedeværelse av resistens i både Storfjorden og Midfjorden. Tolkningen baserer seg på smeltepunktetsverdien til de ulike parallellene. Smeltepunktet forteller på hvilken temperatur DNA-nukleotidtråene splittes i en smeltepunktsanalyse.

Fra analysene for organofosfat var 56% sannsynlig sensitiv, 6% sannsynlig resistent og 39% tvetydige (Figur 9). Av lakselus fra Dryna var sannsynligvis 54% sensitiv og 4% resistent mot organofosfat. Resterende 42% ga tvetydige prøvesvar (Figur 10). Resultatene for organofosfat fra både Dryna og Gudmundset er usikre. Baseparene splittet seg på 73°C hos resistente gener, og 72.5°C hos sensitive. Mutasjonen for organofosfat gjør at Tymin blir byttet ut med Adenin. Som vist i Figur 5 vil Tymin alltid kobles til Adenin, hvor baseparet bindes av en dobbel hydrogenbinding. Denne dobbeltbindingen vil ikke forandres dersom Tymin blir byttet ut med Adenin. Ettersom både det sensitive og resistente genet har en slik dobbeltbinding, vil analysen ha vanskeligheter med å skille smeltepunktene. Analysene for organofosfat gir en indikasjon på hvilke gener som er sensitive og hvilke som er resistente, men dette kan ikke sies med 100% sikkerhet. Analysen gir en pekepinn på hvordan tilstanden kan være.

Behandling med bruk av organofosfat har ikke blitt brukt på Dryna siden 2014. På Gudmundset ble organofosfat brukt som behandlingsmetode i 2021, men før dette hadde ikke stoffet blitt brukt siden 2016. Den lave andelen av resistent lus kan derfor skyldes lite bruk av organofosfat på anleggene de siste årene.

Fra analysen av pyretroider var rundt 42% resistent, 44% sensitiv og 14% ga inkonklusive prøvesvar (Figur 9). Av lakselusen fra Gudmundset var 60 % resistent og 40% sensitiv mot pyretroider. For Dryna viste resultatene en 35% resistens mot pyretroid, 46% var sensitive og 15% inkonklusiv. 4% ga negativt prøvesvar (Figur 10). Til kontrast fra organofosfat blir Cytosin byttet ut med Tymin under mutasjon for pyretroid-resistens. Det går da fra å være en trippelbinding mellom baseparene til en dobbeltbinding, hvorav det igjen blir lettere å oppdage

mutasjonen. Det høye nivået av resistens mot pyretroid kan ikke forklares med en nylig høy bruk av stoffet. Pyretroid har ikke blitt brukt til avlusning siden 2014 på Dryna og 2016 på Gudmundset. Prøvesvarene viste likevel en høy resistensandel mot virkemiddelet. Hva dette skyldes er usikkert, men det kan tyde på at mutasjonsgenet for resistens bruker lang tid på å bli vasket ut. Lakselusen er altså resistent mot pyretroid flere år etter bruk. Lusevandring kan også gi et økt resistensnivå, dersom lusen som vandrer til anleggene kommer fra områder med et høyt pyretroidbruk.

For både organofosfat og pyretroid var det kun én prøve som var resistent mot begge stoffene (Tabell 6). Dette kan gi en indikasjon på at det fortsatt finnes et multiresistent gen hos lakselus. Ut fra prøvesvarene kan vi anta at det ikke er en like høy andel organofosfat-resistens som pyretroid-resistens (se Tabell 6). Analysemetoden som ble brukt var mindre egnet til å skille mellom resistent og sensitiv for organofosfater sammenlignet med pyretroider. Resultatene for organofosfat var derfor noe mer usikre. Denne usikkerheten kan begrunnes i fraværet av en tydelig forskjell på hydrogenbindingene mellom baseparene. Dette kan forklare et påfallende høyt antall tvetydige paralleller bestående av en sensitiv og en resistent referanse/kontroll. Ulike metoder av PCR egner seg til forskjellige analyser. Bruk av TaqMan som probe egnet seg ikke for å skille resistente mot sensitive gener hos lakselus. Det ble derfor tatt i bruk SYBR Green Dye som fargestoff da denne kunne lage en smeltepunktsskurve som skiller resistente og sensitive gener fra hverandre. Metoden viste seg ikke like egnet for organofosfat som pyretroid, og andre metoder vil dermed egne seg bedre for en mer sikker analyse for organofosfat.

Testingen av lakselus fra de to anleggene ble fordelt og behandlet på ulike tidspunkt. Denne praksisen minimerte risiko for krysskontaminering og feilplassering. Pipettering på PCR er en mulig feilkilde når det kommer til geografisk plassering. Flere lus fra Dryna var adult, mens lus fra Gudmundset varierte mellom adult og preadult. Tilstand på parasittene fra de to anleggene var også svært forskjellige. Lus fra Dryna var i god stand. Gudmundset hadde fått en litt hardere behandling. Hverken lusens alder eller tilstand skal imidlertid ha noe å si i en PCR-test. Grunnet gode rutiner og en rekke forhåndsregler er sannsynligheten for feil i disse analysene lav. Skalpell ble byttet ut mellom hver lus og pinsett ble desinfisert for å unngå kontaminering. Pipettering over i PCR-plater ble utført på en systematisk måte hvor det var god oversikt over hvilke brønner DNA allerede var plassert i og hvilke som gjenstod. At det var to deltakere på lab muliggjorde krysskontroller av hverandres arbeid, samt at prosedyrer ble utført på en trygg og god måte. Parallell G6 og H6 har både en kontroll og referanse med svært lavt smeltepunkt

og anses som en analytisk feil. Feilen kan skyldes for lite tilsatt DNA og/eller kontaminering som har medført at målgenet ikke ble amplifisert som det skulle.

#### **4.2 Utvikling i resistens hos lakselus (2002-)**

Figur 2 viser data fra flere undersøkelser i Nord-Atlanteren. Tallene fra Vest-Norge i 2002 antyder en betydelig overvekt genotyper som linkes til nedsatt følsomhet mot organofosfat og pyretroid. En stor andel av lakselus var på dette tidspunktet også resistent mot organofosfat (Fjørtoft *et al.*, 2021). Utviklingen fra 2002 til 2009 viser at den største andelen fortsatt var sensitiv mot begge virkestoffene, mens andelen som var resistent mot organofosfat hadde gått ned. Dette var samtidig som det ble registrert en økning i pyretroid-resistens. I 2014 var  $\frac{3}{4}$  av analysert lus multiresistent, altså resistent mot både organofosfat og pyretroid. Av resterende analyser var en liten andel resistent mot kun organofosfat og en enda mindre kun mot pyretroid (Fjørtoft *et al.*, 2021). Det foreligger ikke spesifikk data rundt resistensutvikling i Midfjorden, men tidligere forskning omtaler nærliggende områder (Fjørtoft *et al.*, 2021). Romsdalsfjorden ligger rett innenfor Midfjorden og det kan argumenteres for at de har en sammenlignbar utvikling. I Storfjorden og Romsdalsfjorden var den største andelen i 2014 både sensitiv mot organofosfat og pyretroid. Foruten lakselus som var sensitive mot begge kjemikalier, var ca. 25% resistent mot enten organofosfat eller pyretroid i Storfjorden, og ca. 25% i Romsdalsfjorden (Figur 3) (Fjørtoft *et al.*, 2021). Det var altså en mindre andel resistens i disse to fjordene enn for store deler av Norges Vest-kyst i 2014.

Fra den aktuelle studien for Dryna og Gudmundset viser resultatene en moderat utviklende trend. Den sensitive andelen for begge kjemikalier er fortsatt stor, men til forskjell fra 2014 er det en økning i pyretroid-resistens. Økningen kan linkes til en økt bruk av kjemikalet. Gudmundset brukte pyretroider til avlusning i både 2015 og 2016 (Figur 11), dette samtidig som forbruket nasjonalt var på et svært høyt nivå fra 2014 og utover (Tabell 1).

Våre resultater fra våren 2022 viser at andelen som er sensitiv holder samme nivå, mens antall som har en spesifikk resistens øker. En svært liten del av analysert lus kan trolig tolkes som multiresistente, mens resistente lus mot pyretroid ligger på rundt 42%. Det er en stor andel som er sensitiv mot organofosfat, og det er lite som tyder på at organofosfat-resistens utgjør en betydelig andel av analyseprøvene (Figur 9).

Generelt er det en betydelig større tilstedeværelse av resistens på Gudmundset enn på Dryna, 60% mot 35% (pyretroid) og 10% mot 4% (organofosfat). Gudmundset har hatt en hyppigere bruk av kjemikalier enn Dryna (Figur 11), og resistens kan derav være mer utbredt i

populasjonen. Med en større grad av resistens vil det ta lenger tid før resistens-genet i populasjonen vaskes ut. Dryna har i motsetning til Gudmundset ikke gjeninnført bruken av organofosfat, men viser fortsatt tegn til resistens mot kjemikalet (4%). Nivået kan skyldes en tidligere stor bruk hvor resistens henger igjen eller anleggets plassering.

De to anleggene er plassert i hver sin fjord. Gudmundset ligger sør for Dryna. Plasseringen er innenfor lusevandringen sin antatte rekkevidde (Havforskningsinstituttet, 2018) og kan følge nordgående strømmer. Havforskningsinstituttets modelleringer anslår luselarvers utbredelse til alt fra flere titalls- til hundretalls kilometer, dette avhengig av strøm og temperatur (Havforskningsinstituttet, 2018). Vanntransport nordover mellom Dryna og Gudmundset (Stene, Gansel and Jansen, 2018) i kombinasjon med lakselusens pelagiske stadier, fra nauplius til copepoditt, åpner også for krysskontaminering (Dalvin and Oppedal, 2019). Selv om anleggene ligger innenfor lusevandringens antatte rekkevidde, har anleggene mest sannsynlig to ulike lusepopulasjoner, da resultatene er såpass ulike (Figur 10).

Kontamineringsrisikoen er gjerne større fra mer nærliggende anlegg, men risikoen avhenger av lokale strømforhold, sesong og sjøtemperatur. Nærliggende anlegg kan ha tidevannsstrøm og/eller saktegående strøm, hvor lakselus larvene kan forflyttes innenfor utviklingen av copepoditt stadiene. Det er krevende å forske på kontaminering av lus ettersom det tar tid før den blir smittsom. Lus fra fiktivt anlegg A kan altså flyte forbi anlegg B i nauplius stadiet, for å så infisere laks på anlegg C når den er ferdig utviklet til copepoditt. Forskning i kontekst av virus har blitt gjort på utskiftning av vannmasser i området (Stene, Gansel and Jansen, 2018). Modellen (Vedlegg 2) viser hvordan utvekslingen medfører kontakt mellom ulike anlegg. På Dryna sees en gjensidig utveksling av vannmasser med blant annet Juvika og Myrane, rett vest for anlegget. Det kan derfor antas at det deles lusepopulasjon, og risikoen for kontaminering anses som høy (Vedlegg 2).

Siden 90-tallet har bruken av kjemikalier på anleggene variert. Gudmundset, i Storfjorden, tok opp bruken av organofosfat i 2021, noe som kan forklare vårt resultat på 10% resistens. Dryna har holdt seg til mekanisk og kjemisk avlusning i form av hydrogenperoksid. Hverken organofosfat eller pyretroider har blitt brukt på anlegget siden 2014 (Figur 11). Med 8 år uten bruk av stoffene hadde det vært naturlig å forvente et fravær av resistens, da både for organofosfat og pyretroid. Resultatene viser derimot at 4% av lusen er resistent mot organofosfat og 35% mot pyretroid (Figur 10). Tilstedeværelsen av mutasjoner i populasjonen er påfallende med tanke på det lange fraværet. Risikoen for kontaminering fra Gudmundset anses som til stede, men lav. BarentsWatch har imidlertid registrert bruk av organofosfatet

azamethiphos til avlusning i 2021 og i 2019 på Jurvika og Myrane (Vedlegg 3, Vedlegg 4). Siden anleggene mest sannsynlig deler lusepopulasjon, som følge av utskiftningen av vannmassene (Vedlegg 2), vil en behandling og en eventuell resistensutvikling på et anlegg kunne påvirke de andre.

Innrapporteringer (BarentsWatch, 2022) i regionen viser altså en gjeninnføring av medikamenter hvor det tidligere er blitt registrert omfattende resistensutvikling. Våre prøver fra anleggene viser en klar motstandsdyktighet mot pyretroider, men et mer moderat resultat rundt organofosfat. Dette kan være grunnlaget for en avventende bruk av pyretroider på anleggene. Ingen nærliggende anlegg, som ikke har fritak fra luserapportering, har brukt pyretroider siden 2016 (BarentsWatch, 2022). Deltamethrin ble sist brukt på Gudmundset i 2016. Azamethiphos ble som sagt brukt på stedet i 2021, men hadde før denne avlusningen en pause på 5 år (Figur 11).

Vedlegg 1 og Tabell 1 viser en innføring av emamectin benzoate samtidig med azamethiphos, men et totalt fravær av hydrogenperoksid og deltamethrin siden 2016. Utvikling av resistens gir en periodevis bruk av kjemikalier. Kjemikalier med nedsatt effekt ser en nedgang i bruk. Bruken tas så opp igjen i løpet av 5-7 års tid når den aktuelle resistensen er borte. Dette stiller imidlertid spørsmål rundt hvordan prøvene viser resistens mot organofosfat etter kun et års bruk.

Tilstedeværelsen av resistens kan skyldes kontaminering av lakselus fra andre anlegg som har tatt i bruk behandling med aktuelle kjemikalier. Men dette åpner samstundes for at resistensgenet kan ha ligget latent i genomet, for å nå komme til uttrykk. Dersom mutasjonsgenet ligger latent, vil DNA-sekvensen være inaktiv. Ved en gjenopptaking av kjemiske avlusningsmetoder vil mutasjonsgenet bli uttrykt etter kort tid (Moody and Basten, 1990). Forrige periode med betydelig bruk av azamethiphos fra 2009 til 2016, altså et spenn på 7 år (Tabell 1). Hvis genet har ligget latent, og blir uttrykt som resistent, gir dette grunnlag for å anta en relativt kort periode hvor det ses en vesentlig effekt av middelet.

I perioden mellom 2014 til 2017 var det en liten nedgang i bruken av kjemisk behandling mot lakselus. Fra 2017 har nivået vært relativt stabilt, men med en liten økning igjen i 2021. Veterinærinstituttets resistenstesting i 2021 viste at det fremdeles var et høyt resistensnivå hos lakselusen ved bruk av medikamentelle behandlinger. Resultatene viste også en økt toleranse mot ferskvannsbehandling i områder der dette var hyppig brukt. For pyretroidet deltamethrin og organofosfatet azamethiphos, viste trenden derimot en liten nedgang i resistens mot stoffene. Dette til tross for en økt bruk av azamethiphos de siste tre årene (Helgesen *et al.*, 2022). Våre



kilder nevner ikke noe om mengden som blir brukt på de ulike anleggene ved hver behandling, kun den årlige mengden nasjonalt. Det kan altså ikke utelukkes bruk av høyere konsentrasjoner på enkelte anlegg for å nå en ønsket effekt.

### 4.3 Veien videre

Lakselus er og blir et stort problem. Kostnader av samtlige lusebehandlinger estimeres til 9,17 kr pr HOG som utgjør den største posten under andre driftskostnader (Kalager and Hellen, 2018). Nye konsepter som landbasert oppdrett og havmerder med behandlingsfri drift kommer, men innføring i stor skala tar tid. Utviklingen er heller ikke problemfri. Oppdrett på land er svært dyrt tenkt i laks pr kubikkmeter og havmerder som Nordlaks havfarm måtte nylig ta i bruk kitinhemmeren teflubenzuron (Bøhren, 2020). Ventede resultater fra nye konsepter er altså til dels ufullstendige, og en stabil behandlingsfri drift er ikke oppnådd i vesentlig skala. Næringen vil etter alle tegn fortsette å være avhengig av ulike avlusningsmetoder i nærmeste fremtid, og da også kjemiske metoder. Motstandsdyktighet er ikke kun et fenomen i kjemisk avlusning. Testing av lakselus ved anlegg med hyppig bruk av ferskvannsbad viser en økende osmotisk toleranse (Mattilsynet, 2022) og anlegg med rensefisk registrerer økte forekomster av blank lus (Harasimczuk, Øvergård and Tørud, 2021). Seleksjonstrykket en avlusning medfører kan bidra til et mangfold av mutasjoner. Det ses nå en gjeninnføring av allerede vidt brukte kjemiske grupper der tidligere resistensutvikling er godt dokumentert. Den aktuelle undersøkelsen har bekreftet tilstedeværelse av resistens for pyretroider og mest sannsynlig organofosfat. Tegn til resistens mot organofosfat har vært lave de siste årene, men lakselusen ser ut til å ha en særdeles kjapp resistensutvikling mot middelet. Pyretroider på sin side har ikke blitt gjeninnført ved anleggene omtalt i denne undersøkelsen. Det er naturlig å anta en tilbakeholdenhet grunnet tilstedeværelsen av resistens på begge anleggene. Effekten ved en gjeninnføring vil altså mest sannsynlig være lav, og frarådes. Resistensutviklingen hos organofosfat bør kartlegges videre og en vurdering tas med sikker data. Gitt et tenkt fremtidig fravær av resistens mot begge midlene, bør gjeninnføringen skje i kombinasjon med flere medikamenter som kan rulleres. En varierende bruk kan hindre en ny rask fremvekst av resistens, men dette krever en sammensatt og systematisk bruk felles for alle anlegg der nok medikamenter kan rulleres. Det har gått 10 år siden et nytt medikament sist kom på det norske markedet. Benchmarks ectosan brukes på brønnbåt og påstås av produsenten å ha en opp mot 100% effekt (Evans, 2018). Dette kan være mulig med en lukket og kontrollert behandling fra innføring. Hvis imidlertid individer skulle overleve i enkelte behandlinger vil vi mest sannsynlig se en fremvekst av resistente populasjoner. Hverken pyretroider eller organofosfat

har hatt denne muligheten. Hvis ingen lus overlever, kan ikke resistens utvikles. Om Ectosan opprettholder en opp mot 100% effekt, eller ender som tidligere midler, vil tiden vise.

## 5. Konklusjon

Lakselus, *Lepeophtheirus salmonis*, har vært et stort problem i oppdrettsnæringen i flere tiår. Ved utvikling av resistens mot kjemisk behandling mot organofosfat på tidlig 90-tallet, pyretroid på sent 90-tallet og emamectin benzoate på tidlig 2000-tallet, har lakselus tømt havbruksnæringens verktøykasse og medført enorme kostnader. Dette studiet har undersøkt om lakselus fortsatt viser en trend til resistens mot pyretroid og organofosfat, selv etter flere år uten bruk av stoffene. Viktigheten av å undersøke tilstedeværelse av resistens er stor. Hvis en resistens vaskes ut, kan det argumenteres for en gjeninnføring av det aktuelle kjemikaliet hvis nytteverdien er til stede.

Resultatene diskutert i oppgaven gir en indikasjon på en vedvarende tilstedeværelse av resistens mot både pyretroid og organofosfat. Analysene forteller at det selv med kun et års bruk kan finnes resistens mot organofosfat i lakselus. Ulike populasjoner viser en trend til ulik resistensutvikling. I områder, som regel i Nord-Norge og på Vestlandet hvor oppdrett er en stor næring, viser det seg at resistensen er høyere enn på eksempelvis Sørlandet hvor oppdrett ikke er like utbredt. Å undersøke strømsystemer inn og ut av fjorder, og plassere anlegg i områder hvor smitte fra nærliggende fjorder er lite sannsynlig, kan en redusere risikoen for spredning av resistent lakselus. Videre kan det oppfordres til å ikke gjeninnføre bruk av pyretroid da lakselus fortsatt viser en trend til høye resistens-nivåer. Utdypende tester om resistens mot organofosfat og kartlegging av resistensutviklingen anbefales før det besluttes å ta i bruk stoffet. Resultatene viser også tegn til resistens mot organofosfat. Organofosfat blir brukt i dag og bruken, med potensialet for videre resistensutvikling, bør oppfølges. I og med at det kun ble analysert 36 lus, vil ikke det gi et godt grunnlag for å forklare trenden til resistens. Men ved å sammenligne resultatene med historisk data kan vi anta at det er en vedvarende pyretroid-resistens, mens det har skjedd en reduksjon i resistens mot organofosfat. Dette til tross for et 6 års fravær av pyretroider på Gudmundset og 8 år på Dryna.

## Referanser

- Aaen, S.M. *et al.* (2015) "Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture," *Trends in Parasitology*, 31(2), pp. 72–81. doi:10.1016/j.pt.2014.12.006.
- Amundsen, B. (2022) *Norsk fiskeoppdrett har «betydelige utfordringer», ifølge ny rapport*, <https://forskning.no/fiskehelse/norsk-fiskeoppdrett-har-betydelige-utfordringer-ifolge-ny-rapport/1994153>.
- Aslam, B. *et al.* (2018) "Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis," *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, pp. 1645–1658. doi:10.2147/IDR.S173867.
- Baklien, A.T. (2020) *Nok et rekordår i oppdrettsnæringen*, <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/nok-et-rekordar-i-oppdrettsnaeringen>.
- BarentsWatch (2022) *Fiskehelse*, <https://www.barentswatch.no/fiskehelse/>.
- Berg, T. (2017) *Slik fungerer avlusninga - og så mye koster den å utføre*, <https://ilaks.no/slik-fungerer-avlusninga-og-sa-mye-koster-den-a-utfore/>.
- Bøhren, L. (2020) *Raser mot kjemikaliebruk på Havfarmen: – Spiller russisk rulett*, <https://e24.no/hav-og-sjoemat/i/GaP1eV/raser-mot-kjemikaliebruk-paa-havfarmen-spiller-russisk-rulett>.
- Boxaspen, K. *et al.* (2017) *Miljø. Lakselus, betydning, problem og behandling. Hvor mye havbruk tåler norskekysten? Genetiske interaksjoner*.
- Bredal, W., Vågen, I. and Reinnel, H. (2000) *Behandling mot lakselus i oppdrettsanlegg, SLK-publikasjon*. Oslo.
- Brun, E. *et al.* (2022) *Fiskehelse rapporten 2021 Veterinærinstituttet 2*. Available at: [www.vetinst.no](http://www.vetinst.no).
- Dalvin, S. (2020) *Generell biologi*, <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>.
- Dalvin, S. and Oppedal, F. (2019) "Utvikling av lakselus ved ulike temperatur og lys," *Rapport fra havforskningen*, 13.
- Dyrevernalliansen (2021) *Mattilsynet avlyser varslet forbud mot termisk avlusning*, <https://kommunikasjon.ntb.no/pressemelding/mattilsynet-avlyser-varslet-forbud-mot-termisk-avlusning?publisherId=5050259&releaseId=17905773>.
- Fagerbakke, C. (2020) *Dette er trafikklyssystemet*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2020/februar/trafikklys>.
- Fjørtoft, H.B. *et al.* (2021) "Losing the 'arms race': multiresistant salmon lice are dispersed throughout the North Atlantic Ocean," *Royal Society Open Science*, 8(5), p. 210265. doi:10.1098/rsos.210265.
- Fjørtoft, H.B. (no date) *Resistent lakselus*. Ålesund. Available at: <https://lakseelver.no/news-2015/en-dodelig-parasitt>.
- Fossum, S. and Dissen, E. (2021) *PCR (polymerasekjedereaksjon)*, [https://sml.snl.no/PCR\\_-\\_polymerasekjedereaksjon](https://sml.snl.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon).

- Gismervik, K. et al. (2017) *Mekanisk avlusing med FLS-avlusersystem-dokumentasjon av fiskevelferd og effekt mot lus*, Veterinærinstituttets rapportserie. Oslo.
- Gismervik, K. et al. (2019) *Foreløpig oppsummering på bestilling: Vurdering av termisk avlusing*. Available at: <https://kommunikasjon.ntb.no/data/attachments/00748/6d958b89-eedd-4770-8453-e2c67dee7307.pdf>.
- Gjerdrum, C.W. (2020) *Oppdrettslaksen kveles av varmere hav*, <https://forskning.no/fisk-fiskehelse-hav-og-fiske/oppdrettslaksen-kveles-av-varmere-hav/1681682>.
- Harasimczuk, E., Øvergård, A.-C. and Tørud, B. (2021) "Kan lakselusen kamuflere seg for rensefisken - pigmentering og resistensutvikling," *Norsk Fiskeoppdrett*, 3, pp. 44–45.
- Havforskningsinstituttet (2018) *Resistens hos lakselus*, <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/resistens-hos-lakselus>.
- Helgesen, K.O. et al. (2017) *The surveillance programme for resistance to chemotherapeutants in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2016*.
- Helgesen, K.O. et al. (2022) *The surveillance programme for resistance in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2021, Surveillance program report*. Available at: [www.vetinst.no](http://www.vetinst.no).
- Helgesen, K.O., Jansen, P. and Horsberg, T.E. (2018) *Emamektin benzokat mot lakselus-Forbruk og behandlingsstrategier vurdert med tanke på resistens*. Available at: [https://www.legemiddelsok.no/\\_layouts/15/Preparatomtaler/Spc/1999-04254.pdf](https://www.legemiddelsok.no/_layouts/15/Preparatomtaler/Spc/1999-04254.pdf).
- Hoddevik, B. and Press, M. (2019) *Smertefullt med avlusing i varmt vann*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2019/mars/smertefullt-med-avlusing-i-varmt-vann>.
- Kalager, F.S. and Hellen, T. (2018) *Kostnader knyttet til behandling mot lakselus i norsk havbruksnæring*. Master's thesis. Universitetet i Stavanger.
- Karlsen, Ø. (2019) *Effekter av lakselus på vill laksefisk*, <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/effekter-av-lakselus-pa-vill-laksefisk>.
- Karlsen, Ø. et al. (2020) *KUNNSKAPSSTATUS LAKSELUS 2020 Effekt av lakselus på vill laksefisk (2010-2019)*.
- Kaur, K. et al. (2015) "Mechanism behind Resistance against the Organophosphate Azamethiphos in Salmon Lice (Lepeophtheirus salmonis)," *PLOS ONE*, 10(4), p. e0124220. doi:10.1371/journal.pone.0124220.
- Kierulf, P. (2018) *Bioassay*, <https://sml.snl.no/bioassay>.
- Langdalen, A. (2020) *DNA*, <https://snl.no/DNA>.
- Legemiddelbruk i oppdrettsnæringen* (2018). Available at: [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/legemidler\\_til\\_fisk/sluttrapport\\_-\\_mattilsynets\\_tilsyn\\_med\\_legemiddelbruk\\_i\\_oppdrettsnaeringen\\_20152017.31171/binary/Sluttrapport%20-%20Mattilsynets%20tilsyn%20med%20legemiddelbruk%20i%20oppdrettsn%C3%A6ringen%202015-2017](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/legemidler_til_fisk/sluttrapport_-_mattilsynets_tilsyn_med_legemiddelbruk_i_oppdrettsnaeringen_20152017.31171/binary/Sluttrapport%20-%20Mattilsynets%20tilsyn%20med%20legemiddelbruk%20i%20oppdrettsn%C3%A6ringen%202015-2017).
- Mæland, R.B. (2020) *Studie: - Rensefisk ingen universalkur mot lakselus*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2020/mars/rensefisk-ingen-universalkur-mot-lakselus>.

Mattilsynet (2016) *Fakta om lakselus og lakselusbekjempelse*, [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/fiske\\_og\\_skjellsykdommer/lakselus/fakta\\_om\\_lakselus\\_og\\_lakselusbekjempelse.23766](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/fakta_om_lakselus_og_lakselusbekjempelse.23766).

Mattilsynet (2022) *Resistenstesting mot legemidler og ferskvann hos lakselus 2021*, [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/fiske\\_og\\_skjellsykdommer/lakselus/resistenstesting\\_mot\\_legemidler\\_og\\_ferskvann\\_hos\\_lakselus\\_2021.46186](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/resistenstesting_mot_legemidler_og_ferskvann_hos_lakselus_2021.46186).

Moody, M.E. and Basten, C.J. (1990) "The evolution of latent genes in subdivided populations.," *Genetics*, 124(1), pp. 187–197. doi:10.1093/genetics/124.1.187.

Naturvernforbundet (2020) *Oppdrett*, <https://naturvernforbundet.no/oppdrett/>.

Nilsson, J. *et al.* (2019) "Sudden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon," *Veterinary and Animal Science*, 8, p. 100076. doi:10.1016/j.vas.2019.100076.

Øvergård, A.-C. and Hamre, L.A. (2020) "Lakselus/vert-interaksjoner," *Naturen*, 144(5), pp. 199–206. doi:10.18261/issn.1504-3118-2020-05-08.

Overton, K. *et al.* (2019) "Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review," *Reviews in Aquaculture*, 11(4), pp. 1398–1417. doi:10.1111/raq.12299.

Pettersen, V.L. (2021) *Tiltak mot lakselus mer effektivt enn først antatt*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2021/juni/tiltak-mot-lakselus-mer-effektivt-enn-forst-antatt>.

Poppe, T.T. *et al.* (2018) "Termisk behandling av laks," *Norsk veterinærtidsskrift*, 130(nr 3), pp. 148–156.

Regjeringens Havstrategi (2017) *Ny vekst, stolt historie Regjeringens havstrategi*. Available at: [file:///Users/45aasola/Downloads/nfd\\_havstrategi\\_uu.pdf](file:///Users/45aasola/Downloads/nfd_havstrategi_uu.pdf).

Statistisk sentralbyrå (2020) *Akvakultur (avsluttet i Statistisk sentralbyrå)*, <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>.

Stene, A., Gansel, L. and Jansen, M.D. (2018) "Sluttrapport Strategier for å begrense spredning av virus mellom sjølokaliteter med laksefisk – fokus på Salmonid Alphavirus (SAV) og Pancreas Disease (PD)," *FHF prosjekt: 901005* [Preprint].

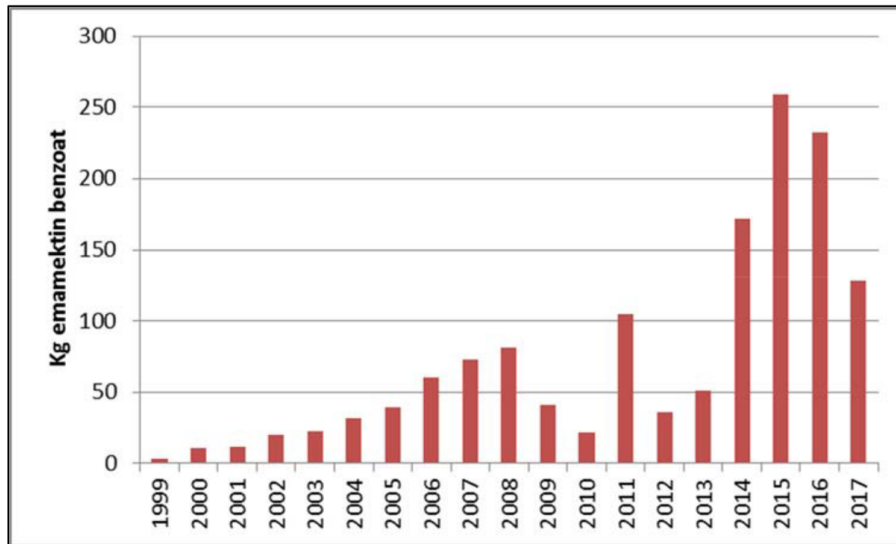
Thermo Fisher (2014) *Real-time PCR handbook*.

Veterinærinstituttet (no date) *Lakselus*, <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/lakselus>.

# Vedlegg

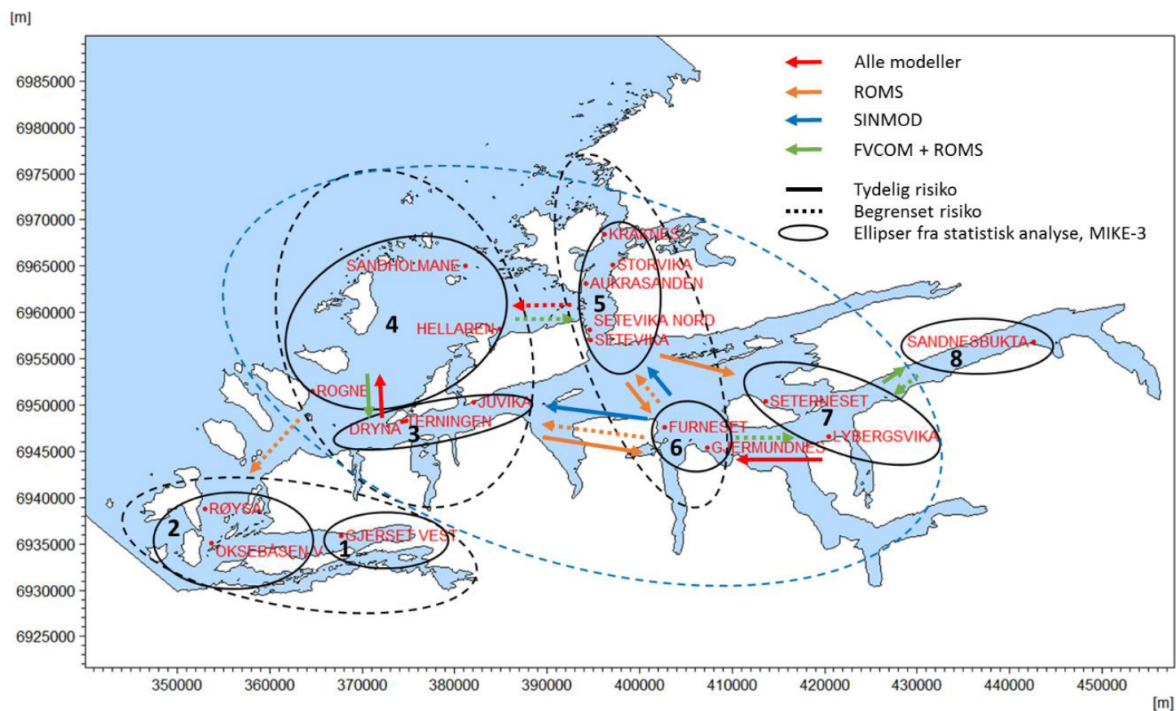
## Vedlegg 1

Innrapportert salg av kilo Emamectin benzoat Folkehelseinstituttet (Helgesen, Jansen and Horsberg, 2018).



## Vedlegg 2

Resultater fra modellene for havstrøm og virusspredning kombineres. Sterk sirkel betyr stor kontakt (gjensidig), stiplet sirkel vil si at det er mindre sannsynlig, men det er kontakt. Blå sirkel vil si at det potensielt er kontakt.



## Vedlegg 3

Tiltak mot lakselus Juvika. Anlegget ligger i samme fjord som Dryna.

17	2022	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
37	2021	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
27	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
25	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
24	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
36	2020	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
43	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
37	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
30	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
39	2017	12260	Juvika	rensefisk		1694	Grøngylt	601	hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2017	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
25	2017	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
37	2016	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
29	2016	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
15	2016	12260	Juvika	medikamer badebehan	Hydrogenperoksid				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
38	2015	12260	Juvika	rensefisk		1694	Grøngylt	1500	hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
27	2015	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2015	12260	Juvika	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
28	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
28	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
14	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
46	2013	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
45	2013	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
35	2013	12260	Juvika	rensefisk		1693	Bergnebb	2500	hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66345	6,696519	5	Stadtil Hustadvika
6	2013	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66345	6,696519	5	Stadtil Hustadvika
16	2012	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66345	6,696519	5	Stadtil Hustadvika

## Vedlegg 4

Tiltak mot lakselus Myrane. Anlegget ligger i samme fjord som Dryna.

14	2022	27215	Myrane	medikamer badebehan	Annet virkestoff				delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
52	2021	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
50	2021	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
37	2021	27215	Myrane	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
36	2021	27215	Myrane	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
35	2021	27215	Myrane	medikamer forbehandling	Emamectin benzoat				hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
40	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
31	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
27	2019	27215	Myrane	medikamer badebehan	Azamethiphos				delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
27	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
7	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
24	2018	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
23	2018	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
9	2018	27215	Myrane	rensefisk		222120	Rognkjeks (	2375	delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika

## Forord

Bacheloroppgaven er skrevet våren 2022. Oppgaven tar for seg utviklingen av pyretroid- og organofosfat-resistens hos lakselus i perioden 2002-2022. Det har vært ønskelig å kartlegge dagens resistenssituasjon med intensjon om å kunne anbefale eller fraråde bruk av kjemikaliene.

Gjennom studiet har studentene delt en interesse for havbruk og utfordringene næringen står ovenfor, da både de biologiske og økonomiske. Oppgaven har belyst våre interesser og la grunnlaget for valg av videre utdanning.

Takk til våre veiledere Lars C. Gansel, Ann-Kristin Tveten og Anne Stene for god akademisk veiledning.



## Sammendrag

Havbruksnæringen anses som den nye oljen, men hemmes av biologiske faktorer som lakselus. Parasitten presser laksenæringens profittmarginer, muligheten til å opprettholde god fiskevelferd og ivareta nærliggende økosystemer. Det benyttes ulike avlusningsmetoder for å holde lusepåslag nede, hvorav kjemiske har vært foretrukket. Stor bruk i Romsdalsfjorden og Storfjorden frem til 2016 ga resistente lusepopulasjoner, nedsatt effekt og derav utfasing av organofosfat og pyretroider. I denne oppgaven har vi analysert lus fra Dryna og Gudmundset og funnet resistens-gen for begge kjemikaliene. Resultatene viser at 42% av testet lus var resistent mot pyretroider og at 10% sannsynligvis var resistent mot organofosfat. Analysene baserer seg på et begrenset antall prøver og er ikke representativt for lusepopulasjonene, men kan gi en pekepinn på dagens situasjon. Det diskuteres videre om resistensnivåene kan skyldes krysskontaminering mellom nærliggende anlegg, et latent gen i populasjonen, og/eller feil bruk av kjemikalier. Resistensnivået av pyretroider er svært høyt og en gjeninnføring frarådes.

Andelen sensitive lakselus mot pyretroider er nå rundt 1/3 på Dryna og 1/2 på Gudmundset. En avlusning med 50% overlevelse blant lus er ikke effektiv. For å kunne ha en effektiv behandling uten overdrevne konsentrasjoner bør resistensnivået senkes ytterligere. Da til rundt samme målte nivåer som organofosfat, eller ideelt sett 0%. Ved en gjeninnføring av samtlige kjemikalier i et fravær av resistens, kan behandlingene kontrolleres, rulleres og resistensutvikling minimeres. Utviklingen bør følges over tid med et oppskalert volum på prøvetakningen. Mer sikkerhet kan eventuelt fastsette en beslutning rundt gjeninnføring av pyretroider og eller en eventuell utfasing av organofosfat.

## Abstract

Aquaculture is considered the new oil, but the industry is hampered by biological factors, such as salmon lice. The parasite challenges profit margins, the opportunity to maintain good fish welfare and safeguard nearby ecosystems. Various de-licing methods are used to keep lice infestation down, of which chemical-based methods has been preferred. Extensive use in Romsdalsfjorden and Storfjorden until late 2016 resulted in resistant lice populations, reduced efficiency, and consequentially an outfacing of organophosphate and pyrethroids. In this thesis the students have analyzed lice from Dryna and Gudmundset and found a resistance gene for both chemicals. The results show that 42% of the lice tested were resistant to pyrethroids and that 10% probably were resistant to organophosphate. The analyzes are based on a limited number of samples and are not representative of the lice populations but can give an indication of the current situation. A partially high level of resistance after a long absence of chemicals may be due to cross-contamination between nearby plants, a latent gene in the population, and / or incorrect use of chemicals. The level of resistance against pyrethroids is substantial, and a reintroduction is therefore consequently not recommended. The proportion of sensitive salmon lice against pyrethroids is now approx. 1/3 on Dryna and 1/2 on Gudmundset. A de-licing with a near 50% survival among lice is not efficient. Thus, to maintain a certain level of efficiency, without excessive concentrations, the level of resistance should be lowered further. The result should amount to the same as measured levels of organophosphate, or ideally 0%. By reintroducing all chemicals in the absence of resistance, the treatments can be controlled, varied and the development of resistance minimized. Developments should be monitored over time with a scaled-up volume of sampling, to determine a decision to reintroduce pyrethroids or even a possible phasing out of organophosphate.

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Introduksjon .....</b>	<b>5</b>
<i>1.1 Lakselus .....</i>	<i>5</i>
<i>1.2 Avlusningsmetoder .....</i>	<i>7</i>
<i>1.3 Resistensutvikling .....</i>	<i>8</i>
<i>1.4 Analysemetoder for studier av resistensutvikling hos lakselus .....</i>	<i>13</i>
<i>1.5 Problemstilling .....</i>	<i>14</i>
<b>2. Material og Metode .....</b>	<b>15</b>
<i>2.1 Prøvemateriale .....</i>	<i>15</i>
<i>2.2 DNA-isolering .....</i>	<i>15</i>
<i>2.3 qPCR/Real-time PCR .....</i>	<i>16</i>
<b>3. Resultat .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Diskusjon .....</b>	<b>23</b>
<i>4.1 Virkning av behandlingsmetoder mot lakselus .....</i>	<i>23</i>
<i>4.2 Utvikling i resistens hos lakselus (2002-) .....</i>	<i>26</i>
<i>4.3 Veien videre .....</i>	<i>29</i>
<b>5. Konklusjon .....</b>	<b>30</b>
<b>Referanser .....</b>	<b>31</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>34</b>
<i>Vedlegg 1 .....</i>	<i>34</i>
<i>Vedlegg 2 .....</i>	<i>34</i>
<i>Vedlegg 3 .....</i>	<i>35</i>
<i>Vedlegg 4 .....</i>	<i>35</i>

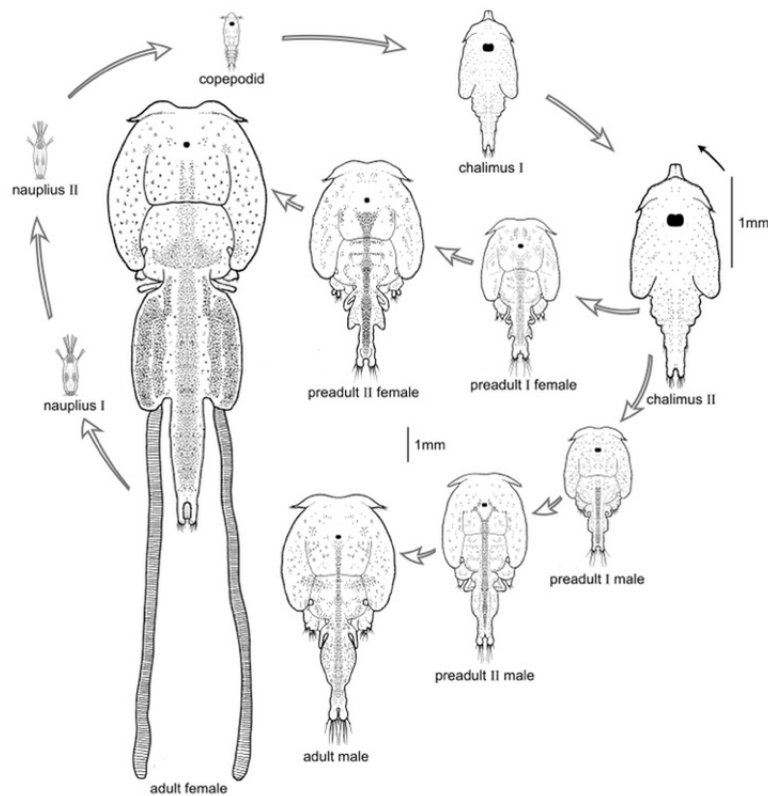
# 1. Introduksjon

De siste 20 årene har salgsvolumet i den norske havbruksnæringen økt fra 200.000 tonn laks i 1998 til 1.8 millioner tonn i 2018 (Baklien, 2020). Havbruk er nå Norges største eksportnæring etter petroleum. Solberg-regjeringen la i 2017 frem «regjeringens havstrategi» som legger opp til en dobling i antall årsverk innen 2030 og en femdobling innen 2050. (Regjeringens Havstrategi, 2017). Forholdet mellom villaks og oppdrettslaks er i dag 1:1000, og det store volumet byr på utfordringer både for miljø og produkt (Naturvernforbundet, 2020). En stor biomasse på et begrenset areal gir økte forekomster samt spredning av bakterier, virus og parasitter. Ved lusepåslag følger et svekket immunforsvar, da fra selve lusen, men også den kommende avlusningen (Veterinærinstituttet, no date). De siste årene har forekomster av CMS (hjertesprekk) hatt en markant økning hvor sykdommen linkes til belastning under avlusning (Amundsen, 2022). Luseproblematikken begrenser nye konsesjoner hvilket er høyst problematisk for en næring i vekst. Laksepriser har hatt en jevn økning, og i andre kvartal av 2022 ligger den på 107kr/kg. Etterspørselen av laks på verdensmarkedet er stor, men tilbudet begrenset. Potensialet for vekst hemmes av lakselus-problematikken og høy dødelighet, da ofte som følge av “hardføre” avlusningsmetoder. En effektiv og skånsom avlusning har potensiale til å åpne opp for nye konsesjoner samt redusere et registrert svinn på 15.5% (Brun *et al.*, 2022), dette i en 71 milliarders næring (Statistisk sentralbyrå, 2020).

## 1.1 Lakselus

Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er en ektoparasitt. Den lever på overflaten til verten, altså på huden til laksen. Parasitten spiser slim, hud og blod på verten som kan sitte igjen med betydelige sår. Dette kan videre gjøre fisken mer mottakelig for infeksjoner samt skape problematikk rundt saltbalanse (Veterinærinstituttet, no date).

Lakselusen har 8 livsstadier (Figur 1), hvorav de tre første er frittlevende. Her flyter lakselusen fritt i vannmassene. Copepoditten (stadium 3) er den som fester seg til laksen. Den er her svært liten, ca. 0.8mm, og er derfor vanskelig å finne. På chalimus I og II (stadium 4-5) har lakselusen festet seg til verten og omtales derfor som fastsittende stadier. Preadult I, II, og adult er de tre siste livsstadier (stadium 6-8). Her beveger lakselusen seg rundt på huden til laksen. På adult-stadiet kan lusen pare og reproducere seg. De adulte hunnene produserer parvis med egg-sekker som hver kan inneholde mellom 150 til 400 egg. Frem til eggene klekkes og frigis til de frie vannmasser, er de festet i lange sekker på hunnen (Dalvin, 2020).



**Figur 1** – Lakselusens livsstadier (Dalvin, 2020).

Over de siste tiårene er det registrert en jevnt økende forekomst av lusa i takt med økende biomasse. Parasitten presser laksenæringens profittmarginer, muligheten til å opprettholde god fiskevelferd og ivareta økosystemer. Ved et vesentlig lusepåslag vil laksen pådras fysiske skader samt vise tegn til stress (Veterinærinstituttet, no date). Kombinasjonen svekker immunforsvaret, øker dødeligheten og reduserer kvaliteten på sluttproduktet (Brun *et al.*, 2022).

Lusens overlevelses- og reproduksjonsevne reduseres ved fraværet av en vert (Øvergård and Hamre, 2020). Svakheten utnyttes ved avlusning, men også proaktivt gjennom brakklegging og bruk av trafikklyssystemet. Trafikklyssystemet deler opp kysten i ulike soner og regulerer produksjonsvolumet i forhold til lusepåslaget. Systemet bygger på samarbeid mellom ulike institusjoner for å regulere regioner. Havforskningsinstituttet koordinerer overvåkning, forskning og rådgivning. Dataen tolkes av en ekspertgruppe og regionale rapporter lages. Rapporten tolkes igjen av en styringsgruppe som rådgiver Nærings- og Fiskeridepartementet. Summen gir et grønt, gult eller rødt lys som betegner en tillat økning eller senkning i biomasse (Fagerbakke, 2020). Det er en rekke ulike praksiser for å holde lusetall nede. Forebyggende metoder skal begrense påslag av lakselus. Dette kan være bruk av luseskjørt eller holde laksen

på et lavere sjikt. Når lusepåslaget overstiger et visst nivå, må anlegget ta i bruk avlusningsmetoder (Pettersen, 2021).

## 1.2 Avlusningsmetoder

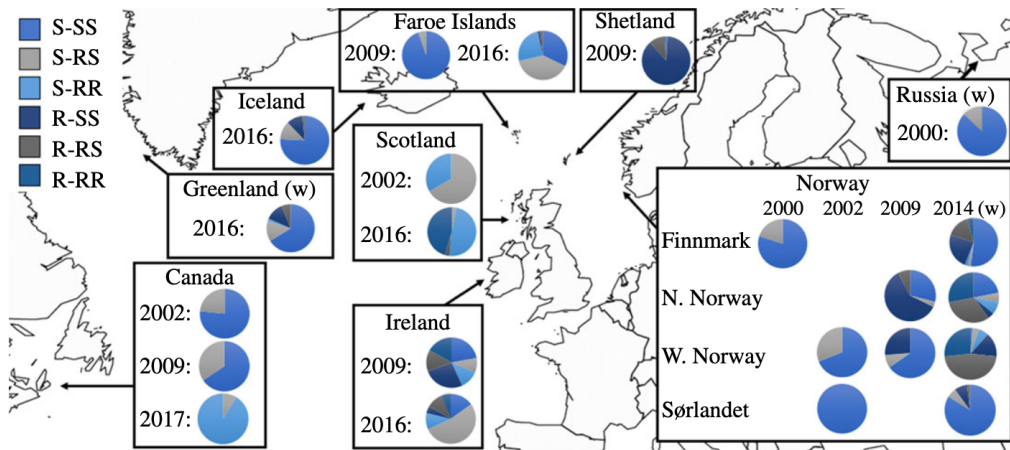
Flere behandlingsmetoder mot lusen har blitt tatt i bruk. Med unntak av ferskvannsbad kan behandlingene deles inn i gruppene termisk, mekanisk og kjemisk.

Ferskvannsbad vil foregå i en brønnbåt hvor fisken vil ligge mellom 4 og 8 timer. Laks er en anadrom art og vil ikke ta skade. Lusen vil derimot få forstyrret sin osmotiske balanse og dø. Resultatet vil variere mellom lusens livsstadier med en høy effekt på copepoditter, og en lavere hos preadulte og kjønnsmodne (Berg, 2017). Ferskvannsbad skjer gjerne i kombinasjon med høyere temperaturer og kan da gå under termisk avlusning.

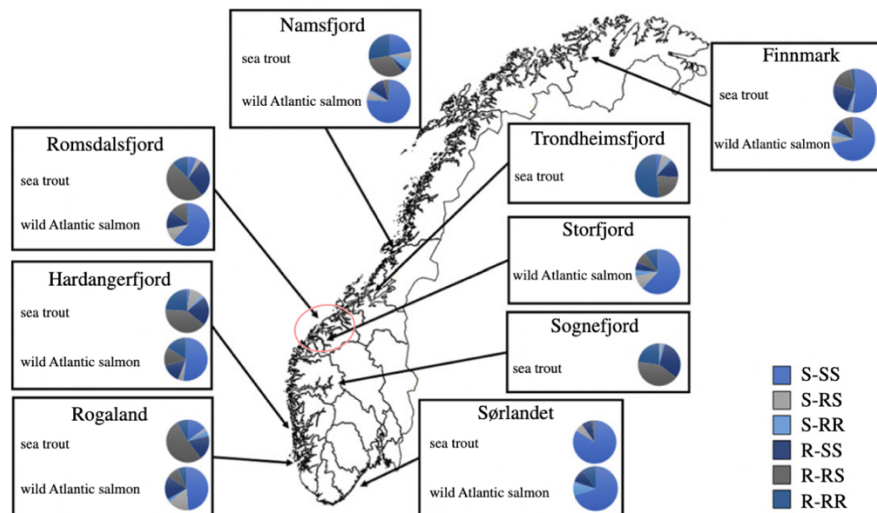
Termisk behandling utnytter laksen og lusas ulike varmeterskel. Atlantisk laks trives best i 8-14°C. På nedre sikt observeres en langsom vekst, før den så maksimeres på 13°C. Over 16°C gir laksen stressignaler (Gjerdrum, 2020). Mot 34°C vil overlevelsen være svært begrenset og alt over 28°C regnes som dårlig dyrevelferd (Nilsson *et al.*, 2019). Lakselusen trives best på samme nivåer som laksen, men vil i det øvre sjiktet bli lammet og slippe verten. Det brukes i dag to ulike metoder. Optilicier benytter et åpent vannbad med temperert vann mens Thermolicer er et gjennomstrømningssystem. Behandlingene anses å være mellom 90% og 100% effektive, men medfører dårlig fiskevelferd (Poppe *et al.*, 2018). Mekanisk avlusning omfatter fysisk fjerning av lus på laksen. SkaMik, Hydrolicer og Flatsunds Caligus er slike systemer. SkaMik benytter spylekammer og børster, mens Hydrolicer og Flatsund trykkspyling. Metodene anses som relativt hardhendte hvor fiskevelferden reduseres. Trengsel, skjelltap og gjelleblødning gir en merkbar dødelighet i etterkant av behandling (Gismervik *et al.*, 2017). Kjemisk avlusning omfatter all bruk av kjemisk fremstilte medikamenter i havbruk med mål om å fjerne lus. Fra sent 90-tallet til i dag har en rekke medikamenter blitt utviklet. Medikamentene kan gis gjennom bad i brønnbåt, en til dels lukket merd eller gjennom fôr. Gjennomgående for alle er en god, men så avtagende effekt. Dette skyldes resistens (Aaen *et al.*, 2015).

### 1.3 Resistensutvikling

Kontrollerte laboratorieforsøk og prøvetakning i Nord-Atlanteren har vist fremvekst av multiresistent lakselus. Undersøkelsene omfatter hovedsakelig lus fra oppdrettslaks hvor kjemisk behandling har blitt utført, men også fra villaks og sjørøret i områder med fravær av kjemisk behandling (Figur 2, Figur 3) (Fjørtoft *et al.*, 2021).

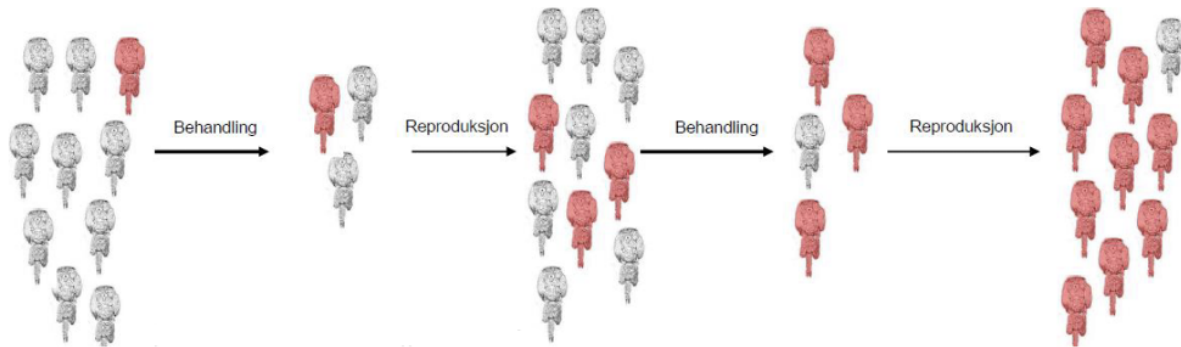


**Figur 2** – Hyppighet av resistens og sensitivitet for pyretrorider og organofosfat i Nord-Atlanteren. Analyser fra 2000-2017. Organofosfat-resistens er markert med RS eller RR, pyretrorid-resistens med R, multiresistens med R-RR eller R-RS og sensitiv med S eller SS (Fjørtoft *et al.*, 2021).



**Figur 3** – Resistens hos lakselus i Storfjorden og Romsdalsfjorden. Multiresistent lus har genotypene R-RR eller R-RS mens fullt sensitive lus har S-SS. Lus som er resistent mot kun organofosfat er markert med S-RR eller S-RS, mens kun pyretrorid-resistens er markert med R-SS (Fjørtoft *et al.*, 2021).

Uansett behandlingsform er muligheten for enkeltindividers overlevelse til stede. Avlusning gir et seleksjonstrykk hvor gunstige mutasjoner premieres. Som vist i Figur 4, kan et individ sine gener tyngre en hel populasjon. Dersom rødt individ overlever en behandling, vil det bidra med overproporsjonalt mange avkom inn i populasjonen. Følsomheten og resistens i populasjonen vil så endres (Havforskningsinstituttet, 2018).



**Figur 4** – Illustrert av Kari O. Helgesen. Resistensutvikling i populasjon som følge av seleksjonstrykk. Sensitivt tegnet som grå, resistent som rød (Fjørtoft, no date).

Hvis en behandling har en merkbar redusert effekt, omtales populasjonen med nedsatt følsomhet. Ved nedsatt følsomhet vil det gitte nivået av kjemikalier for en effektiv behandling øke. Når effekten er borte, brukes begrepet resistens. Det er vanlig at en populasjon viser nedsatt følsomhet før den oppnår resistens (Havforskningsinstituttet, 2018).

Det kan trekkes parallell til behandling av bakterier med antibiotikum. Nye resistente grupper oppdages daglig hvor kommersielt utbredt antibiotikum ikke lenger fungerer. Leger vil så bruke nyere, mindre utbredte typer til behandling, men etter hvert vil også denne effekten avta. Utviklingen av nye antibiotikum vil ikke kunne holde tempoet til bakteriers mutasjoner (Aslam *et al.*, 2018).

I likhet med antibiotikum blir kjemisk behandling mindre og mindre effektivt til det til slutt oppstår resistens. Nye medikamenter tas i bruk, men syklusen gjentas. I tilfeller med resistens mot to eller flere behandlingstyper, omtales populasjonen som multiresistent. Ettersom få kjemiske behandlingsformer er godkjent i Norge vil det ikke være mulig å opprettholde en variert bruk av midler eller lengre pauser uten bruk. Dette kunne forebygget resistens mot et enkelt middel (Aslam *et al.*, 2018).

Organofosfat, pyretroid, hydrogenperoksid og emamectin benzoate, er de fire mest omsatte virkestoffene innen kjemisk behandling. Før dagens intensive havbruk var lusesesongen



avgrenset til sommer- og høstmånedene ettersom laksen da befant seg til havs eller i ferskvann. Havbruk har derimot gitt lus verter året rundt. Påslaget er fortsatt størst i mai måned, men dette er avhengig av produksjonsvolum, bruk av avlusning og havtemperatur (Karlsen *et al.*, 2020). Tilstedeværelsen har vokst eksponentielt med utbredelsen av havbruk, og med det utvikling av behandlingsmetoder (Fjørtoft *et al.*, 2021). Først ut var ulike former for organofosfat, men med en økende resistens ble medikamentet ineffektivt. Neste på banen var pyretroider som igjen ble erstattet av hydrogenperoksid. I 1999 tok emamectin benzoate delvis over og ble bransjestandard i en periode. Lite overraskende skulle historien gjentas, og det tok ikke lang tid før emamectin benzoate også mistet sin effekt. Når verktøykassen er tom, blir tidligere stoffer gjeninnført (Fjørtoft *et al.*, 2021). Tabell 1 viser oversikt over kjemikalier med omsetting fra 2008 til 2017, og en bruk som går i sykluser.

**Tabell 1** – Midler brukt i kjemisk avlusning perioden 2008-2017. Kilo aktiv substans (*Legemiddelbruk i oppdrettsnæringen*, 2018).

Lusemiddel	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Azametifos	66	1884	3346	2437	4059	3037	4630	3904	1269	204
Cypermethrin	32	88	107	48	232	211	162	85	48	8
Deltamethrin	39	62	61	54	121	136	158	115	43	14
Diflubenzuron	-	1413	1839	704	1611	3264	5016	5896	4824	1803
Emamectin	81	41	22	105	36	51	172	259	232	128
Teflubenzuron		2028	1080	26	751	1704	2674	2509	4209	293
Hydrogenperoksid		308	3071	3144	2538	8262	31577	43246	26597	9277

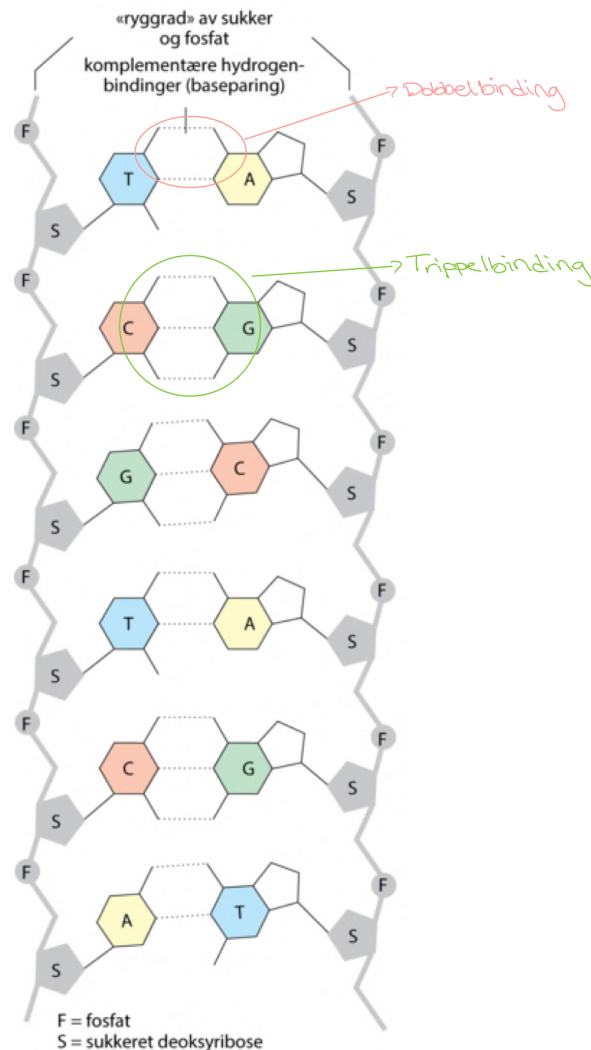
Del av tabell som er markert i grått er før start av legemiddelkampanjen.

Hydrogenperoksid brukes i bad på brønnbåt. Tidligere har middelet blitt sluppet i havet etter bruk, men praksisen har vist seg å ha en rekke ringvirkninger på økosystemet. Mest utbredt er formeringsdefekter hos reker og andre krepsdyr. Hydrogenperoksid har også en betydelig dødelighet hos laks og undersøkelser viser tilfeller av resistensutvikling hos lusen, hvorav nedsatt følsomhet er hyppigst (Helgesen *et al.*, 2017).

Emamectin benzoate benyttes gjennom fôr. Bruken i antall kilo emamectin benzoate økte betydelig fra 1999-2008, og igjen fra 2014-, (Vedlegg 1). Lusens økende motstandsdyktighet er en betydelig faktor. Det er manglende forskning på området og det er ikke fastsatt hvor mange gener som er involvert i resistensutviklingen (Helgesen, Jansen and Horsberg, 2018).

Resistens mot pyretroider kan ha ulike opphav. Mest kjent er *kdr*-mutasjonen, men denne er ikke funnet i Norge. Det er derimot registrert en mutasjon i Norge som gir økt metabolsk kapasitet og en endring i spenningsavhengige natriumkanaler. Slike natriumkanaler er

pyretroiders virkested, og det kan tenkes at en endring i aminosyrens elektrokjemiske egenskaper hemmer virkningsgraden (Boxaspen *et al.*, 2017). Figur 5 illustrerer en dobbel heliks bygd opp fire forskjellige nukleotidkjeder. Nukleotidkjedene består av et sukker- og fosfatmolekyl samt en base.



**Figur 5** – DNA-struktur (Langdalen, 2020). Mutasjon er varige endringer i baserekkefølgen i DNA-et. Adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og tymin (T) bygger opp de ulike baseparene. Er igjen bundet sammen av dobbel eller trippel hydrogenbinding.

Mutasjon for resistens mot pyretroid illustreres med at normalvarianten *cytB* (det sensitive genet), Cytosin (C), blir byttet ut med Tymin (T). Dobbel hydrogenbinding i resistant gen skilles ved 77°C. Trippel hydrogenbinding i sensitivt gen skilles ved 77.5°C.

### Gen med mutasjon for resistens

TTCTTACAGACAAAGCTAAAGCCACTACCCCCC**T**AACTTATTTGGGATAGACCG  
CAAATAGCATAAGCAAACAAAAAATACCATTCAGGTTGAATGTGAGCAGGAGT  
TACT

### Gen for sensitivitet

TTCTTACAGACAAAGCTAAAGCCACTACCCCCC**C**AACTTATTTGGGATAGACCGC  
AAAATAGCATAAGCAAACAAAAAATACCATTCAGGTTGAATGTGAGCAGGAGTT  
ACT

Av tre kommersielt brukte organofosfat (metrifonat, diklorvos og azametifos) er det kun azametifos som fortsatt er godkjent for bruk. Behandlingen foregår i form av bad med hel eller delvis tildekket merd. Middelet tas opp gjennom lusens gjeller og hydrofobe kitinlag, men også gjellene til laksen. Etter å ha spredt seg i vev og celler vil organofosfatet virke enzymhemmende. Ved en hemming av enzymet acetylkolinesterase (AChE) vil nedbryting av transmittorsubstansen acetylkolin hindres, organisme overstimuleres og reseptorer blokkeres. Etersom virkningen er irreversibel, vil en regenerering kreve dannelse av nye enzymer. Midlene trenger raskere inn i lusen enn fisken som også evner en raskere metabolisme. Jo raskere metabolisme, desto raskere vil midlene bli omsatt til inaktive produkter. Forutsetningene gir en ulik dødsrate på 5% mot 95% hos lakselus (Bredal, Vågen and Reinnel, 2000). Resterende lus omfatter i hovedsak yngre fastsittende chalimus-stadier der virkningsgraden er lav (25%) (Bredal, Vågen and Reinnel, 2000).

Mutasjonen for organofosfat-resistens illustreres med en baseendring til A. Den mest vanlige organofosfat-resistensen er missense-mutasjon *Phe362Tyr* i genet *ace1a* (Kaur *et al.*, 2015). For det sensitive genet, vil basen som blir byttet ut ved resistens være T. Den doble hydrogenbindingen skilles ved 72.5°C ved resistens og 73°C for sensitiv.

### Gen med mutasjon for resistens

ATTTAATTGGAGCGAATAAGGAAGAAGGGAATTATT**A**CATCATGTACTATCTTA  
CAGATCTCTTTAAAATACGGAGAGCG

### Gen for sensitivitet

ATTTAATTGGAGCGAATAAGGAAGAAGGGAATTATT**T**CATCATGTACTATCTTA  
CAGATCTCTTTAAAATACGGAGAGCG

For å unngå utvikling av multiresistens eller utslakting som følge av et gjentakende luseproblem, skjer det en betydelig økt investering innen forebyggende metoder.

Forebyggende metoder som rensefisk kan mulig holde bestanden til en viss grad stabil. Dette forutsatt rette forhold og moderate mengder lus (Mæland, 2020). Enkelte selskaper forsøker også å endre de abiotiske forholdene. Dette omfatter eksempelvis snorkelmerder hvor laksen holdes under det øverste vannlaget, og havmerder hvor anlegget flyttes ut av fjordene til mer værkrevede områder hvor lusepåslaget potensielt kan reduseres.

Analysert lakselus kommer fra Dryna og Gudmundset i Midfjorden og Storfjorden. Pyreotridet deltamethrin ble sist brukt på Gudmundset i 2016 (Storfjorden) og Dryna i 2014 (Midfjorden). Organofosfatet azamethiphos ble sist brukt på Dryna i 2014, men så sent som i 2021 på Gudmundset (Figur 11). Proaktive metoder og mekanisk avlusning er nå mest utbredt, men det er likevel av interesse å undersøke tilstedeværelsen av ulike resistente gen. Hvis et gen ligger latent, kan en mulig resistens raskt vende tilbake ved ny bruk (Moody and Basten, 1990).

#### **1.4 Analysemetoder for studier av resistensutvikling hos lakselus**

Bioassay er mye brukt for kartlegging av resistensutvikling. Metoden baserer seg på eksponering av levende lakselus for utvalgte kjemikalier for å så registrere overlevelse (Kierulf, 2018). I nyere tid har en metode som benytter de aktuelle mål-gen med mutasjoner som prinsipp delvis tatt over.

Real-time PCR (polymerasekjedereaksjon), eller qPCR, er en metode for PCR-analyse. Dette er en kvantitativ metode i motsetning til PCR som er en kvalitativ metode. qPCR kan selektivt kopiere opp et målgen hvor det antas å ha mutasjonen for resistens (Fossum and Dissen, 2021). I qPCR blir det ofte brukt et fluorescerende fargestoff, SYBR Green Dye i amplifikasjonsprosessen som binder seg til dobbelstreng DNA. PCR-metoden amplifiserer målgen, noe som gjør at fluorescensen øker med mengden målgen som kopieres. SYBR Green fargen fører også til at man kan gjennomføre smeltepunktsanalyse som viser hvor lang tid det tar for nukleotidpar å skille seg. Nukleotider er bundet med 2 eller 3 hydrogenbindinger og en smeltepunktskurve kan si noe om sammensetningen av målgen. Variant av gen splittes ved X grader, mens et gen med mutasjon splittes ved Y grader. Smeltepunktsanalysen gjør det mulig å sammenligne sekvensen til målgen med hverandre. En alternativ metode for å markere mutasjon er bruk av qPCR med TaqMan-probe. Metoden bruker prober for å detektere akkumulert DNA (Thermo Fisher, 2014).

## 1.5 Problemstilling

Resistens mot kjemiske avlusningsmidler er en vesentlig utfordring for næringen. Mekaniske avlusningsmetoder har erstattet en tidvis stor kjemikalbruk, men med en høy dødelighet. Fra 2008-2009 økte innrapporteringen av antall ineffektive kjemiske avlusninger. I 2013 kom Mattilsynets overvåkningsprogram for å følge utviklingen av resistens samt hyppighet av behandling. Studiene har vist en økt forekomst av resistens hos lakselus i perioder med økt bruk av kjemiske behandlinger (Aaen *et al.*, 2015). De siste årene har det derimot skjedd en nedgang. Det kan antas at den reduserte bruken av kjemisk avlusning kan bidra til å hindre videre spredning av resistensgener og dermed en lavere frekvens av resistens blant lakselus.

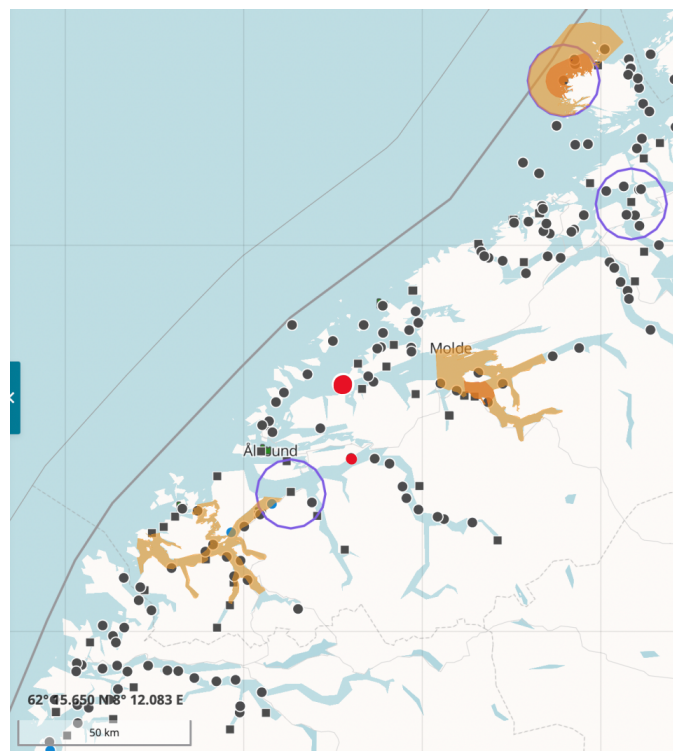
For å undersøke dette har vi i denne oppgaven valgt å analysere 36 lakselus fra to lokaliteter, for pyretroid- og organofosfat-resistens.

Opgaven sikter på å studere om ulike populasjoner i fjordene vil bære en genetisk mutasjon for pyretroider og/eller organofosfat. Statistisk sett vil en gjeninnføring av kjemisk behandling i et område med tidligere resistens vise seg ineffektiv selv med flere år uten. Om dette derimot gjelder etter 8 år er uvisst (Havforskningsinstituttet, 2018).

## 2. Material og Metode

### 2.1 Prøvemateriale

Lakselus ble samlet under telling av laks i utkanten av Midfjorden (Dryna) og midten av Storfjorden (Gudmundset), se Figur 6. Laksen ble lokket med fôr og fanget av en liten kastnot. Lakselus ble bevart i RNAlater og fraktet til laboratoriet for analyse. Tiden fra fangst til lab tok 1-2 dager, hvorav 2 timer var transport. Lakselus ble transportert ved utendørstemperatur til Campus. All videre oppbevaring foregikk på kjølerom. Isolert DNA ble fryst.



**Figur 6** – Kart over de to lokalitetene. Dryna er markert med en større rød sirkel, øverst, mens Gudmundset med en mindre rød sirkel, øst for Ålesund (BarentsWatch, 2022).

### 2.2 DNA-isolering

DNA fra lakselus ble isolert ved bruk av DNeasy blood and Tissue kit fra Qiagen. 20  $\mu$ l proteinase K og 180  $\mu$ l Buffer ATL ble pipettert over i et individuelt eppendorfrør. Lus ble skjært i vevsbiter på 0.5 x 0.5 cm ved hjelp av steril skalpell og plassert i individuelle eppendorfrør. Skalpell ble byttet ut mellom hver lus og pinsett desinfisert for å unngå kontaminasjon. Hver prøve ble markert med tall og bokstav. Dag 1 med 1A, 1B, 1C..., dag 2 med 2A, 2B, 2C... Prøver av lus fra Sognefjorden med en 90% pyretroidresistens ble brukt som kontroll og markert med K1, K2, K3 og K4.

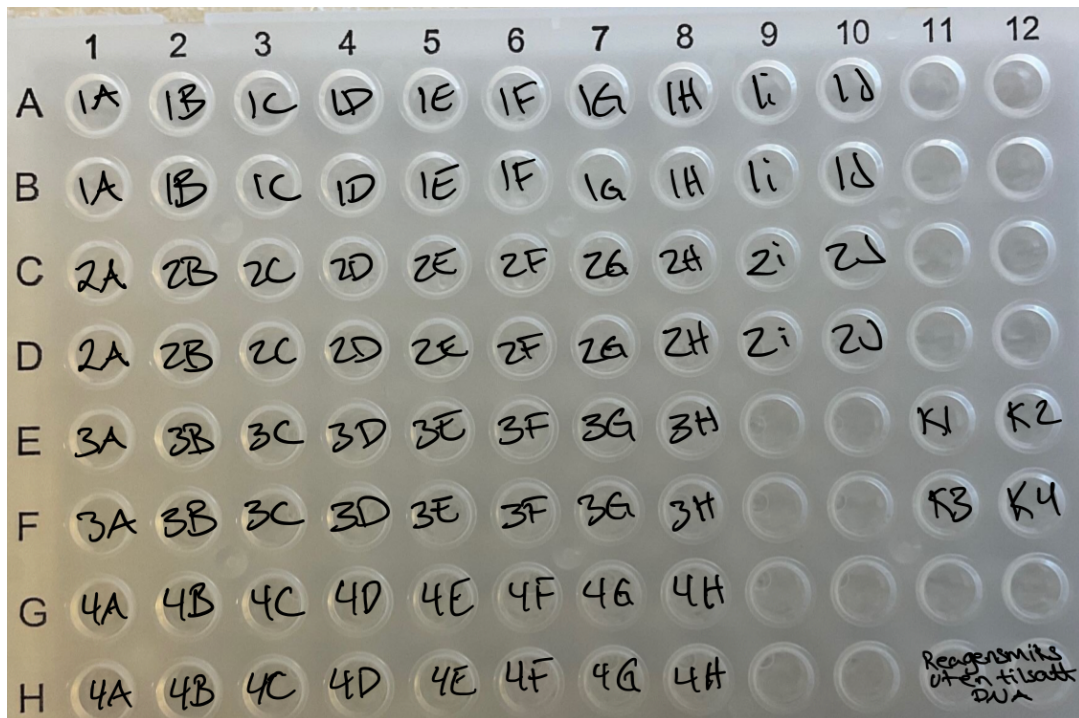
Prøvene ble inkubert i en VWR Digital Heatblock på 56°C i 60 minutter for å løse opp vevet og lysere cellene. Hvert 15 minutt ble rør ristet på vortex. Etter inkubering ble 200 µl Buffer AL ble tilsatt eppendorfrørene og rør ble mikset på vortex før inkubasjon på 70°C i 10 min. 200 µl etanol (96% EtOH) ble pipettert over i eppendorfrørene, blandet på vortex og overført til spinnkolonne med silica-membran som har affinitet for DNA.

Blanding i eppendorfrør ble pipettert over i DNeasy mini spin column og sentrifugert på 8000 rpm (rounds per minute), i 1 minutt. Sentrifugering binder DNA til DNeasy-membranen mens kontaminanter passerer gjennom. Vask utføres for å rense DNA-et for gjenværende kontaminanter slik at en sitter igjen med rent DNA.

DNeasy mini spin column ble plassert i et nytt samlerør og tilsatt 500 µl AW1 (vaskebuffer). Prøvene ble på nytt sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt før DNeasy mini spin column igjen ble plassert i nye samlerør. 500 µl AW2 ble tilsatt og prøvene sentrifugert på 14000 rpm i 3 minutter. AW1 og AW2 sikrer at de kontaminantene som ikke har blitt skylt gjennom membranen så langt i prosessen forsvinner, og at det kun er DNA som sitter igjen på membranen. DNeasy mini spin column ble plassert i eppendorfrør og er nå klar til eluering. 100 µl elueringsbuffer (Buffer AE) ble tilsatt direkte på DNeasy-membranen. Prøven ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt før den ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Prosessen ble gjentatt på nytt, men med 50 µl Buffer AE for at DNA-et skulle bli vasket ut fra DNeasy-membranen og ende opp i eppendorfrøret.

### **2.3 qPCR/Real-time PCR**

qPCR ble utført, ett assay for pyretroid og et for organofosfat. Det ble pipettert ut 13 µl av reaksjonsmiksen bestående av SYBR Green Dye, primer spesifikt for de ulike målgenene og polymerase, og 2 µl DNA over i en PCR-plate. Prøvene ble lagt i paralleller, i tillegg ble det laget to referanseprøver som kun bestod av reaksjonsmiks, samt fire kontrollprøver med 90% pyretroid-resistent lakselus (Figur 7). En plastfilm ble brukt til å forsegle platen, og qPCR-maskinen ble innstilt på 95°C i 3 min og deretter 40 sykluser med 95°C i 20 sekunder, 58°C i 30 sekunder og 72°C i 30 sekunder før smeltepunktanalyse ble utført. En referansefarge, ROX, ble lagt til for å normalisere prøver mellom to brønner og gjorde at prøvene ble sammenlignbare med hverandre. PCR-platen ble lagt i maskinen og analysen ble utført.



**Figur 7** – Figuren viser hvor på PCR-platen ulike prøver ble plassert. K1, K2, K3 og K4 viser hvor kontrollprøvene ble lagt, altså fra 90% pyretroid-resistent laks. Reagensmikst uten DNA ble plassert i brønnene H11 og H12 for kontroll, mens DNA-prøvene ble lagt i paralleller.

A1 Gudmundset	A2 Gudmundset	A3 Gudmundset	A4 Gudmundset	A5 Gudmundset	A6 Gudmundset	A7 Gudmundset	A8 Gudmundset	A9 Gudmundset	A10 Gudmundset	A11	A12
B1 Gudmundset	B2 Gudmundset	B3 Gudmundset	B4 Gudmundset	B5 Gudmundset	B6 Gudmundset	B7 Gudmundset	B8 Gudmundset	B9 Gudmundset	B10 Gudmundset		
C1 Dryna	C2 Dryna	C3 Dryna	C4 Dryna	C5 Dryna	C6 Dryna	C7 Dryna	C8 Dryna	C9 Dryna	C10 Dryna		
D1 Dryna	D2 Dryna	D3 Dryna	D4 Dryna	D5 Dryna	D6 Dryna	D7 Dryna	D8 Dryna	D9 Dryna	D10 Dryna		
E1 Dryna	E2 Dryna	E3 Dryna	E4 Dryna	E5 Dryna	E6 Dryna	E7 Dryna	E8 Dryna			E11 Sognefjorden	E12 Sognefjorden
F1 Dryna	F2 Dryna	F3 Dryna	F4 Dryna	F5 Dryna	F6 Dryna	F7 Dryna	F8 Dryna			F11 Sognefjorden	F12 Sognefjorden
G1 Dryna	G2 Dryna	G3 Dryna	G4 Dryna	G5 Dryna	G6 Dryna	G7 Dryna	G8 Dryna				
H1 Dryna	H2 Dryna	H3 Dryna	H4 Dryna	H5 Dryna	H6 Dryna	H7 Dryna	H8 Dryna			H11 Reagensmikst uten DNA	H12 Reagensmikst uten DNA

**Figur 8** – Viser oversikt over analyser utført. Ti prøver kommer fra Gudmundset og er lagt i paralleller. Dette er de to øverste rekkene, altså A1-A10 og B1-B10. Resterende prøver er samlet fra anlegget på Dryna og dette gjelder da 26 prøver. Også disse prøvene ble lagt i paralleller, og en finner disse på de 6 nederste radene. Fra C1-C10 og ned til H1-H8. Prøver fra Sognefjorden som tidligere har vært analysert ble benyttet som kontroller.



### 3. Resultat

Av totalt 36 prøver var henholdsvis 15 og 16 prøver resistent og sensitiv mot pyretroid (Tabell 2). Dette tilsvarer en prosentandel på 42% resistente og 44% sensitive av alle prøver. Én prøve fikk intet prøvesvar i begge parallellene. 4 prøver får resultat som er inkonklusive.

Av totalt 36 prøver var 10 fra Gudmundset og 26 fra Dryna. Gudmundset fikk et resultat på 6 resistente og 4 sensitive prøver. Dryna viste 9 resistente, 12 sensitive, 4 inkonklusive og 1 prøve uten prøvesvar.

**Tabell 2** - Resultater fra pyretroid qPCR. Prøvene ligger i paralleller med én referanse og én kontroll. DNA fra 1A er plassert i både brønn A1 og B1, DNA fra prøve 1B i A2 og B2, fra prøve 2A i brønn C1 og D1 etc.. De gule feltene, K1, K2, K3 og K4, er kontrollprøver fra lus som er 90% pyretroid-resistent.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
13,33	13,44	12,53	12,43	13,6	13,25	13,51	13,3	13,83	13,46		
77	77,5	77	77,5	77	77	77	77,5	77,5	77		
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10		
13,29	13,29	12,6	12,87	13,9	13,47	13,38	13,3	14,04	13,84		
77	77,5	77	77,5	77	77	77	77,5	77,5	77		
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10		
13,58	11,6	11,4	11,23	12,82	25,32	26	12,01	11,5	12,28		
77,5	77,5	77	77,5	77	68	77	77,5	77,5	77		
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10		
11,5	11,98	11,37	26,45	13,58	11,08	11,16	11,62	10,32	12,4		
77,5	77,5	77	77,5	76,5	77	77	77,5	77,5	77		
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8			E11	E12
13,39	12,46	14,12	14,91	16,28	14,26	14,95	12,3			K1	K2
77	77	77,5	77,5	77	77	77	77,5				
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8			F11	F12
13,35	12,45	25,84	14,38	13,99	15,01	14,92	12,14			K3	K4
77	77	77,5	77,5	76,5	77	77	77,5				
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8				
12,13	13,04	12,81	14,56	13,34	25,09	13,69	13,65				
77,5	77,5	77,5	76,5	77	68	77,5	77				
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8			H11	H12
12,48	12,84	13,2	13,36	13,03	12,88	20,38	12,98			Reagensmiks uten DNA	Reagensmiks uten DNA
77,5	77,5	77,5	77	77	76,5	77,5	77				

**Tabell 3** - Kontrollprøver uten DNA (blå), resistens (rød), sensitiv (grønn). Smeltepunktet for mutasjonsgenet som er resistent er på 72.5°C. For normalvarianten av genet, det sensitive genet, har et smeltepunkt på 73C. Ct-verdier ligger mellom 17.59 og 18.36.

Standard Resistent	17,9	77
Standard Resistent	18,36	77
Standard Sensitiv	17,59	77,5
Standard Sensitiv	17,62	77,5
No template control	No Cq	-
No template control	No Cq	-

Resultatene for organofosfat blir ført som trolig sensitiv eller trolig resistent, noe som kan skyldes usikkerhet knyttet opp mot selve analyse-metoden (Tabell 5). qPCR for organofosfat var altså mindre sikre, men antyder at 2 paralleller er resistente og 20 sensitive. Analysen viser 14 paralleller med tvetydig utslag (Tabell 4).

Av 10 prøver fra Gudmundset var 1 prøve resistent, 6 sensitive og 3 inkonklusive. Av 26 prøver fra Dryna var 1 resistent, 14 sensitive og 11 inkonklusive (Tabell 4).

**Tabell 4** - Resultater fra qPCR for organofosfat. Prøvene ble lagt i paralleller. Én referanse og én kontroll. Gult felt, K1, K2, K3 og K4, er kontrollprøver fra Sognefjorden med 90% pyretroid-resistens.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
16,81	19,1	17,14	16	17,89	18,14	17,36	17,24	18,27	17,52		
73	73	73	73,5	72,5	73	73	73	73	73		
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10		
16,5	17,55	17,11	16,53	17,29	18,23	17,77	17,45	18,32	17,48		
73	73,5	73	73	72,5	73	72,5	73	73	73		
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10		
16,78	15,72	14,97	16,34	15,22	14,85	14,08	14,94	16,27	15,1		
73	73	72,5	73	73	73	73	73	73,5	73		
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10		
15,71	16,32	14,88	16,28	15,72	15,51	No Cq	15,61	15,92	15,32		
73	73	72,5	73	73	73	-	73	73	73		
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8			E11	E12
17,45	17,65	18,09	18,45	16,65	17,45	19,16	16,3			K1	K2
73	73	73	73	73	73	73	73				
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8			F11	F12
17,41	17,55	18,36	18,07	17,47	17,4	19,27	16,54			K3	K4
73	73	72,5	72,5	73	73	73	72,5				
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8				
16,6	17,5	17,15	16,41	15,86	16,64	17,73	17,42				
73	73	72,5	72,5	73	73	72,5	73				
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8			H11	H12
16,11	15,95	17,07	16,36	16,59	16,92	17,57	17,44			Reagensmiks uten DNA	Reagensmiks uten DNA
73	73,5	73,5	73	73,5	73,5	73	73				

**Tabell 5** – Kontrollprøver uten DNA (blå), sannsynlig resistent (rød), sannsynlig sensitiv (grønn). Sannsynlig resistent har et smeltepunkt på 72.5°C, sannsynlig sensitiv på 73°C. Ct-verdier mellom 19.39 og 22.34.

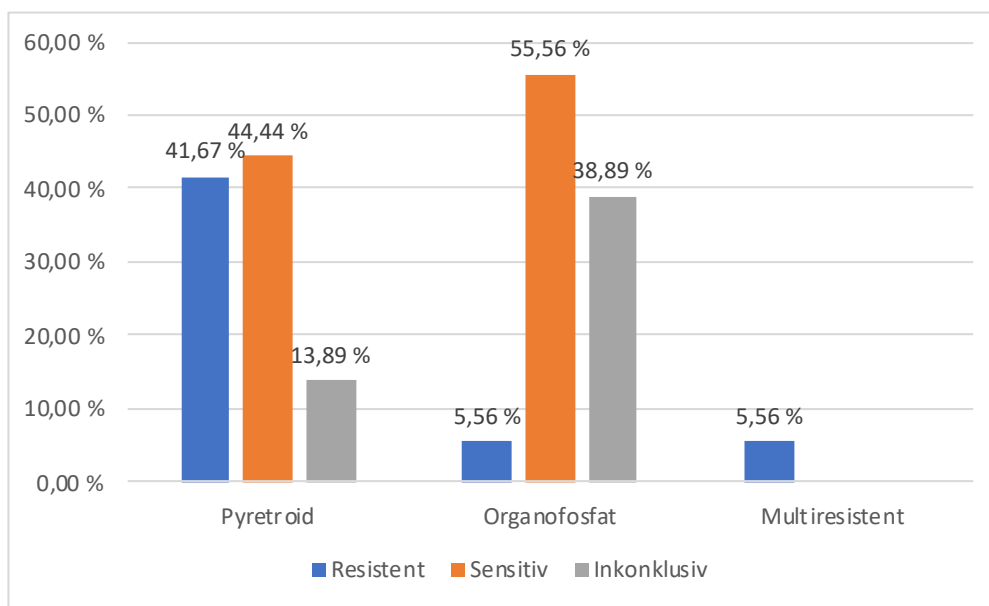
No template control	No Cq	-
No template control	No Cq	-
Most likely sensitive	22,34	73
Most likely sensitive	20,31	73
Most likely resistant	19,39	72,5
Most likely resistant	20,82	72,5

I analysen for sensitivitet og resistens mot pyretroider har 15 paralleller prøvesvar som tilsvarer resistent referanse- og kontrollprøve. 6 av disse er igjen fra Gudmundset og 9 fra Dryna. Videre har 16 paralleller prøvesvar som tilsvarer prøvesvar fra en sensitiv referanse- og sensitiv kontrollprøve. 4 lus er her fra Gudmundset og 12 fra Dryna. Det er ikke registrert noen resultater uten prøvesvar fra Gudmundset, men Dryna har 1 prøve uten svar. Videre for Dryna viser analysen at parallell A5 og B5 (Tabell 6) er resistent mot pyretroid og mest sannsynlig sensitiv for organofosfat. Analysen fra Dryna viser at fem paralleller trolig er sensitive for både organofosfat og pyretroid, mens kun én viser trolig resistens for begge kjemikaliene. Parallell C3 og D3 er mest sannsynlig resistent.

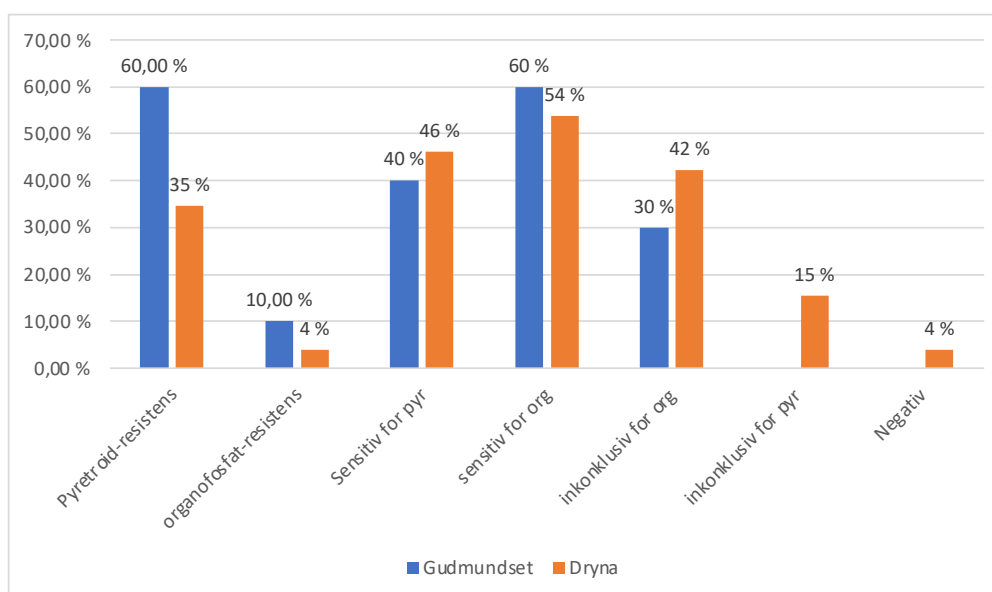
**Tabell 6** - Resultater fra både pyretroid og organofosfat. 2 prøver er resistent og 7 sensitive for begge kjemikaliene.

A1 Pyretroid Organofosfat	A2 Pyretroid Organofosfat	A3 Pyretroid Organofosfat	A4 Pyretroid Organofosfat	A5 Pyretroid Organofosfat	A6 Pyretroid Organofosfat	A7 Pyretroid Organofosfat	A8 Pyretroid Organofosfat	A9 Pyretroid Organofosfat	A10 Pyretroid Organofosfat	A11	A12
B1 Pyretroid Organofosfat	B2 Pyretroid Organofosfat	B3 Pyretroid Organofosfat	B4 Pyretroid Organofosfat	B5 Pyretroid Organofosfat	B6 Pyretroid Organofosfat	B7 Pyretroid Organofosfat	B8 Pyretroid Organofosfat	B9 Pyretroid Organofosfat	B10 Pyretroid Organofosfat		
C1 Pyretroid Organofosfat	C2 Pyretroid Organofosfat	C3 Pyretroid Organofosfat	C4 Pyretroid Organofosfat	C5 Pyretroid Organofosfat	C6 Pyretroid Organofosfat	C7 Pyretroid Organofosfat	C8 Pyretroid Organofosfat	C9 Pyretroid Organofosfat	C10 Pyretroid Organofosfat		
D1 Pyretroid Organofosfat	D2 Pyretroid Organofosfat	D3 Pyretroid Organofosfat	D4 Pyretroid Organofosfat	D5 Pyretroid Organofosfat	D6 Pyretroid Organofosfat	D7 Pyretroid Organofosfat	D8 Pyretroid Organofosfat	D9 Pyretroid Organofosfat	D10 Pyretroid Organofosfat		
E1 Pyretroid Organofosfat	E2 Pyretroid Organofosfat	E3 Pyretroid Organofosfat	E4 Pyretroid Organofosfat	E5 Pyretroid Organofosfat	E6 Pyretroid Organofosfat	E7 Pyretroid Organofosfat	E8 Pyretroid Organofosfat			E11 Sognefjorden	E12 Sognefjorden
F1 Pyretroid Organofosfat	F2 Pyretroid Organofosfat	F3 Pyretroid Organofosfat	F4 Pyretroid Organofosfat	F5 Pyretroid Organofosfat	F6 Pyretroid Organofosfat	F7 Pyretroid Organofosfat	F8 Pyretroid Organofosfat			F11 Sognefjorden	F12 Sognefjorden
G1 Pyretroid Organofosfat	G2 Pyretroid Organofosfat	G3 Pyretroid Organofosfat	G4 Pyretroid Organofosfat	G5 Pyretroid Organofosfat	G6 Pyretroid Organofosfat	G7 Pyretroid Organofosfat	G8 Pyretroid Organofosfat				
H1 Pyretroid Organofosfat	H2 Pyretroid Organofosfat	H3 Pyretroid Organofosfat	H4 Pyretroid Organofosfat	H5 Pyretroid Organofosfat	H6 Pyretroid Organofosfat	H7 Pyretroid Organofosfat	H8 Pyretroid Organofosfat			H11 Reagensmik uten DNA	H12 Reagensmik uten DNA

Prøvene er lagt i paralleller der smeltepunktverdien må være den samme i begge brønnene for at prøven skal kunne tolkes. Denne verdien er den vi finner i de fargede rutene i Tabell 2 og forklarer altså på hvilken temperatur de to DNA-nukleotidtrådene slipper taket fra hverandre. I analysen fra pyretroider er referanse A1 og kontroll B1 registrert med splittelse på 77°C, hvorav begge er markert grønt for resistens. Referanse C1 og kontroll D1 har registrert splittelse på 77.5°C og markeres rødt for sensitiv. Referanse C6 og kontroll D6 har ulikt resultat. C6 er svært lavt på 68°C, og dermed hverken resistent eller sensitiv. D6 ble splittet på 77°C og er resistent. Prøven har altså ulike smeltepunkt og registreres som inkonklusiv. Analysen registrerte fem slike prøver, hvorav fire enten hadde én resistent referanse/kontroll og én referanse/kontroll uten prøvesvar. Referanse G6 og kontroll H6 er den eneste parallellen med både én kontroll og referanse uten prøvesvar.



**Figur 9** – Oversikt over andel resistente og sensitive gen mot pyreteroid og organofosfat. For pyreteroider er rundt 42% resistent, 44% sensitiv og 14% inkonklusiv. For organofosfat viser diagrammet at rundt 6% er resistent, 56% sensitiv og 39% inkonklusiv. To av prøvene fra både pyreteroid og organofosfat er resistent mot begge.



**Figur 10** – Oversikt over andel resistente og sensitive gen mot pyreteroid og organofosfat på de to lokalitetene, Dryna og Gudmundset. Av 10 prøver fra Gudmundset var 60% pyreteroid-resistent, 10% organofosfat-resistent, 40% var sensitiv mot pyreteroider og 60% mot organofosfat, mens 30% var inkonklusiv. Av 26 prøver fra Dryna var 35% resistent mot pyreteroid og 4% mot organofosfat. Sensitiv for pyreteroid og organofosfat var 46% og 54%. 42% fikk et resultat som var inkonklusiv for organofosfat, mens dette var 15% for pyreteroider. 4% av prøvene fikk et negativt svar.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Kjemiske avlusningsmetoder Dryna	Deltamethrin Rensefisk	Deltamethrin Azamethiphos Hydrogenperoksid Rensefisk	Enametrin benzoat Rensefisk	Hydrogenperoksid Mekanisk fjerning	Rensefisk	Mekanisk fjerning	Mekanisk fjerning		Mekanisk fjerning	Medikamentell - annet virkestoff
Kjemiske avlusningsmetoder Gudmundset	Azamethiphos Deltamethrin Rensefisk	Deltamethrin Azamethiphos Rensefisk	Deltamethrin Azamethiphos Hydrogenperoksid Rensefisk	Hydrogenperoksid Deltamethrin Azamethiphos Rensefisk Mekanisk fjerning	Rensefisk	Mekanisk fjerning Medikamentell - annet virkestoff	Mekanisk fjerning Medikamentell - annet virkestoff	Enametrin benzoat Azamethiphos Mekanisk fjerning		Mekanisk fjerning
Utvikling resistens (Fjortoft et al., 2021)	Økende trend	Økende trend	Nedgående trend	Nedgående trend	Nedgående trend					
Matløyrens årlige rapport, konklusjon resistensnivå										
Resistens qPCR 2022 Dryna:										
Organofosfat										4 %
Pyreteroid										32 %
Resistens qPCR 2022 Gudmundset:										
Organofosfat										10 %
Pyreteroid										60 %

**Figur 11** – Kjemiske stoffer brukt under avlusning på anleggene Dryna og Gudmundset fra 2013-2022. Utvikling av resistens fra tidligere analyser samt analyseprøver fra Dryna og Gudmundset i 2022.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Virkning av behandlingsmetoder mot lakselus

Lakselus har vært problematisk for havbruksnæringen siden tidlig 90-tallet hvor de første tilfellene oppsto (Havforskningsinstituttet, 2018). Flere behandlingsmetoder er utviklet, hvorav kjemisk avlusning har vært foretrukket ((Hoddevik and Press, 2019) (Overton et al., 2019)(Gismervik *et al.*, 2019)(Fjørtoft *et al.*, 2021)). En overdreven bruk har medført resistensutvikling og derav redusert effekt av gitte kjemikalier. Resultatene fra analysen av den aktuelle undersøkelsen viser et fortsatt høyt resistensnivå for pyretroid, mens det er tegn på nedgang i resistent lakselus mot organofosfat.

Termisk og mekanisk avlusning anses som svært krevende for laksen. Høye temperaturer under termisk, og fysisk behandling under mekanisk (trenging, spyling, børsting, lufttrykk) gir tydelige stress-signaler hos laksen (Gismervik *et al.*, 2017). Tilfeller av hjertesprekk har steget i samspill med bruken av mekanisk avlusning, og med den dødeligheten (Amundsen, 2022). Dyrevelferden under termisk avlusning er såpass kritikkverdig at mattilsynet planla å forby praksisen, men gikk tilbake på sin beslutning grunnet «manglende kunnskap» (Dyrevernalliansen, 2021). Problematikken rundt kjemisk avlusning på sin side reises ikke primært på bakgrunn av fiskevelferd, men av den nedgående effekten (Havforskningsinstituttet, 2018). Studier har undersøkt bruken av kjemisk behandling og utviklingen av motstandsdyktighet ((Fjørtoft *et al.*, 2021)(Mattilsynet, 2022)). Hvis forbyggende metoder ikke er nok, og en avlusning må til for å fjerne et stort lusepåslag, vil en kjemisk metode være fordelaktig for oppdrettslaksens helse. Dødeligheten av en kjemisk behandling (14%), med organofosfat eller pyretroider, vil være halvparten av en termisk (31%) og like over halvparten av en mekanisk behandling (25%) (Overton *et al.*, 2019).

For å motvirke resistensutvikling har kartlegging av hvor og hvilke stoffer lakselus har utviklet resistens mot vært sentralt. I 2013 innførte Mattilsynet et overvåkningsprogram for å kartlegge utbredelsen av resistens blant lakselus, samt bruk av ulike avlusningsmetoder (Mattilsynet, 2022). Resultatene danner et bilde av dagens situasjon som igjen kan gi videre grunnlag for å revurdere den aktuelle bruken og/eller innføre nye kjemikalier. Det gis her imidlertid ikke noen detaljert oversikt over regionale forskjeller. Å kartlegge resistens på produksjonsområder, eller å få dokumentert en bedring i områder som deler lusepopulasjon, kan være svært fordelaktig for aktuelle beslutningstakere. Havbruk medfører økte nivåer av lakselus i fjordene, både i og utenfor sesong. Dette har stor påvirkning for blant annet villaksens vandring, smolt-fase og

dødelighet ((Mattilsynet, 2016)(Karlsen, 2019)(Karlsen *et al.*, 2020)). Villaksen er en rødlistet art, og lakselusen beregnes til å stå for om lag 10% av den årlige dødeligheten (Karlsen, 2019). Effektive avlusninger vil redusere lakselus i fjordene. Reduserte mengder lakselus vil redusere påslag på oppdrettslaks og villaks, og derav redusere dødeligheten. Kjemisk behandling er både effektiv og skånsom, så lenge resistens ikke er til stede. Vi kan i dag etter flere år uten vesentlig bruk av kjemikalier diskutere om de aktuelle lakselus-populasjonene fortsatt har gen for resistens, om genet ligger latent, eller om genet har forsvunnet helt.

Resultater fra analysene i den aktuelle studien viser en tydelig tilstedeværelse av resistens i både Storfjorden og Midfjorden. Tolkningen baserer seg på smeltepunktetsverdien til de ulike parallellene. Smeltepunktet forteller på hvilken temperatur DNA-nukleotidtråene splittes i en smeltepunktanalyse.

Fra analysene for organofosfat var 56% sannsynlig sensitiv, 6% sannsynlig resistent og 39% tvetydige (Figur 9). Av lakselus fra Dryna var sannsynligvis 54% sensitiv og 4% resistent mot organofosfat. Resterende 42% ga tvetydige prøvesvar (Figur 10). Resultatene for organofosfat fra både Dryna og Gudmundset er usikre. Baseparene splittet seg på 73°C hos resistente gener, og 72.5°C hos sensitive. Mutasjonen for organofosfat gjør at Tymin blir byttet ut med Adenin. Som vist i Figur 5 vil Tymin alltid kobles til Adenin, hvor baseparet bindes av en dobbel hydrogenbinding. Denne dobbeltbindingen vil ikke forandres dersom Tymin blir byttet ut med Adenin. Ettersom både det sensitive og resistente genet har en slik dobbeltbinding, vil analysen ha vanskeligheter med å skille smeltepunktene. Analysene for organofosfat gir en indikasjon på hvilke gener som er sensitive og hvilke som er resistente, men dette kan ikke sies med 100% sikkerhet. Analysen gir en pekepinn på hvordan tilstanden kan være.

Behandling med bruk av organofosfat har ikke blitt brukt på Dryna siden 2014. På Gudmundset ble organofosfat brukt som behandlingsmetode i 2021, men før dette hadde ikke stoffet blitt brukt siden 2016. Den lave andelen av resistent lus kan derfor skyldes lite bruk av organofosfat på anleggene de siste årene.

Fra analysen av pyretroider var rundt 42% resistent, 44% sensitiv og 14% ga inkonklusive prøvesvar (Figur 9). Av lakselusen fra Gudmundset var 60 % resistent og 40% sensitiv mot pyretroider. For Dryna viste resultatene en 35% resistens mot pyretroid, 46% var sensitive og 15% inkonklusiv. 4% ga negativt prøvesvar (Figur 10). Til kontrast fra organofosfat blir Cytosin byttet ut med Tymin under mutasjon for pyretroid-resistens. Det går da fra å være en trippelbinding mellom baseparene til en dobbeltbinding, hvorav det igjen blir lettere å oppdage

mutasjonen. Det høye nivået av resistens mot pyretroid kan ikke forklares med en nylig høy bruk av stoffet. Pyretroid har ikke blitt brukt til avlusning siden 2014 på Dryna og 2016 på Gudmundset. Prøvesvarene viste likevel en høy resistensandel mot virkemiddelet. Hva dette skyldes er usikkert, men det kan tyde på at mutasjonsgenet for resistens bruker lang tid på å bli vasket ut. Lakselusen er altså resistent mot pyretroid flere år etter bruk. Lusevandring kan også gi et økt resistensnivå, dersom lusen som vandrer til anleggene kommer fra områder med et høyt pyretroidbruk.

For både organofosfat og pyretroid var det kun én prøve som var resistent mot begge stoffene (Tabell 6). Dette kan gi en indikasjon på at det fortsatt finnes et multiresistent gen hos lakselus. Ut fra prøvesvarene kan vi anta at det ikke er en like høy andel organofosfat-resistens som pyretroid-resistens (se Tabell 6). Analysemetoden som ble brukt var mindre egnet til å skille mellom resistent og sensitiv for organofosfater sammenlignet med pyretroider. Resultatene for organofosfat var derfor noe mer usikre. Denne usikkerheten kan begrunnes i fraværet av en tydelig forskjell på hydrogenbindingene mellom baseparene. Dette kan forklare et påfallende høyt antall tvetydige paralleller bestående av en sensitiv og en resistent referanse/kontroll. Ulike metoder av PCR egner seg til forskjellige analyser. Bruk av TaqMan som probe egnet seg ikke for å skille resistente mot sensitive gener hos lakselus. Det ble derfor tatt i bruk SYBR Green Dye som fargestoff da denne kunne lage en smeltepunktsskurve som skiller resistente og sensitive gener fra hverandre. Metoden viste seg ikke like egnet for organofosfat som pyretroid, og andre metoder vil dermed egne seg bedre for en mer sikker analyse for organofosfat.

Testingen av lakselus fra de to anleggene ble fordelt og behandlet på ulike tidspunkt. Denne praksisen minimerte risiko for krysskontaminering og feilplassering. Pipettering på PCR er en mulig feilkilde når det kommer til geografisk plassering. Flere lus fra Dryna var adult, mens lus fra Gudmundset varierte mellom adult og preadult. Tilstand på parasittene fra de to anleggene var også svært forskjellige. Lus fra Dryna var i god stand. Gudmundset hadde fått en litt hardere behandling. Hverken lusens alder eller tilstand skal imidlertid ha noe å si i en PCR-test. Grunnet gode rutiner og en rekke forhåndsregler er sannsynligheten for feil i disse analysene lav. Skalpell ble byttet ut mellom hver lus og pinsett ble desinfisert for å unngå kontaminering. Pipettering over i PCR-plater ble utført på en systematisk måte hvor det var god oversikt over hvilke brønner DNA allerede var plassert i og hvilke som gjenstod. At det var to deltakere på lab muliggjorde krysskontroller av hverandres arbeid, samt at prosedyrer ble utført på en trygg og god måte. Parallell G6 og H6 har både en kontroll og referanse med svært lavt smeltepunkt



og anses som en analytisk feil. Feilen kan skyldes for lite tilsatt DNA og/eller kontaminering som har medført at målgenet ikke ble amplifisert som det skulle.

#### **4.2 Utvikling i resistens hos lakselus (2002-)**

Figur 2 viser data fra flere undersøkelser i Nord-Atlanteren. Tallene fra Vest-Norge i 2002 antyder en betydelig overvekt genotyper som linkes til nedsatt følsomhet mot organofosfat og pyretroid. En stor andel av lakselus var på dette tidspunktet også resistent mot organofosfat (Fjørtoft *et al.*, 2021). Utviklingen fra 2002 til 2009 viser at den største andelen fortsatt var sensitiv mot begge virkestoffene, mens andelen som var resistent mot organofosfat hadde gått ned. Dette var samtidig som det ble registrert en økning i pyretroid-resistens. I 2014 var  $\frac{3}{4}$  av analysert lus multiresistent, altså resistent mot både organofosfat og pyretroid. Av resterende analyser var en liten andel resistent mot kun organofosfat og en enda mindre kun mot pyretroid (Fjørtoft *et al.*, 2021). Det foreligger ikke spesifikk data rundt resistensutvikling i Midfjorden, men tidligere forskning omtaler nærliggende områder (Fjørtoft *et al.*, 2021). Romsdalsfjorden ligger rett innenfor Midfjorden og det kan argumenteres for at de har en sammenlignbar utvikling. I Storfjorden og Romsdalsfjorden var den største andelen i 2014 både sensitiv mot organofosfat og pyretroid. Foruten lakselus som var sensitive mot begge kjemikalier, var ca. 25% resistent mot enten organofosfat eller pyretroid i Storfjorden, og ca. 25% i Romsdalsfjorden (Figur 3) (Fjørtoft *et al.*, 2021). Det var altså en mindre andel resistens i disse to fjordene enn for store deler av Norges Vest-kyst i 2014.

Fra den aktuelle studien for Dryna og Gudmundset viser resultatene en moderat utviklende trend. Den sensitive andelen for begge kjemikalier er fortsatt stor, men til forskjell fra 2014 er det en økning i pyretroid-resistens. Økningen kan linkes til en økt bruk av kjemikalet. Gudmundset brukte pyretroider til avlusning i både 2015 og 2016 (Figur 11), dette samtidig som forbruket nasjonalt var på et svært høyt nivå fra 2014 og utover (Tabell 1).

Våre resultater fra våren 2022 viser at andelen som er sensitiv holder samme nivå, mens antall som har en spesifikk resistens øker. En svært liten del av analysert lus kan trolig tolkes som multiresistente, mens resistente lus mot pyretroid ligger på rundt 42%. Det er en stor andel som er sensitiv mot organofosfat, og det er lite som tyder på at organofosfat-resistens utgjør en betydelig andel av analyseprøvene (Figur 9).

Generelt er det en betydelig større tilstedeværelse av resistens på Gudmundset enn på Dryna, 60% mot 35% (pyretroid) og 10% mot 4% (organofosfat). Gudmundset har hatt en hyppigere bruk av kjemikalier enn Dryna (Figur 11), og resistens kan derav være mer utbredt i

populasjonen. Med en større grad av resistens vil det ta lenger tid før resistens-genet i populasjonen vaskes ut. Dryna har i motsetning til Gudmundset ikke gjeninnført bruken av organofosfat, men viser fortsatt tegn til resistens mot kjemikalet (4%). Nivået kan skyldes en tidligere stor bruk hvor resistens henger igjen eller anleggets plassering.

De to anleggene er plassert i hver sin fjord. Gudmundset ligger sør for Dryna. Plasseringen er innenfor lusevandringen sin antatte rekkevidde (Havforskningsinstituttet, 2018) og kan følge nordgående strømmer. Havforskningsinstituttets modelleringer anslår luselarvers utbredelse til alt fra flere titalls- til hundretalls kilometer, dette avhengig av strøm og temperatur (Havforskningsinstituttet, 2018). Vanntransport nordover mellom Dryna og Gudmundset (Stene, Gansel and Jansen, 2018) i kombinasjon med lakselusens pelagiske stadier, fra nauplius til copepoditt, åpner også for krysskontaminering (Dalvin and Oppedal, 2019). Selv om anleggene ligger innenfor lusevandringens antatte rekkevidde, har anleggene mest sannsynlig to ulike lusepopulasjoner, da resultatene er såpass ulike (Figur 10).

Kontamineringsrisikoen er gjerne større fra mer nærliggende anlegg, men risikoen avhenger av lokale strømforhold, sesong og sjøtemperatur. Nærliggende anlegg kan ha tidevannsstrøm og/eller saktegående strøm, hvor lakselus larvene kan forflyttes innenfor utviklingen av copepoditt stadiene. Det er krevende å forske på kontaminering av lus ettersom det tar tid før den blir smittsom. Lus fra fiktivt anlegg A kan altså flyte forbi anlegg B i nauplius stadiet, for å så infisere laks på anlegg C når den er ferdig utviklet til copepoditt. Forskning i kontekst av virus har blitt gjort på utskiftning av vannmasser i området (Stene, Gansel and Jansen, 2018). Modellen (Vedlegg 2) viser hvordan utvekslingen medfører kontakt mellom ulike anlegg. På Dryna sees en gjensidig utveksling av vannmasser med blant annet Juvika og Myrane, rett vest for anlegget. Det kan derfor antas at det deles lusepopulasjon, og risikoen for kontaminering anses som høy (Vedlegg 2).

Siden 90-tallet har bruken av kjemikalier på anleggene variert. Gudmundset, i Storfjorden, tok opp bruken av organofosfat i 2021, noe som kan forklare vårt resultat på 10% resistens. Dryna har holdt seg til mekanisk og kjemisk avlusning i form av hydrogenperoksid. Hverken organofosfat eller pyretroider har blitt brukt på anlegget siden 2014 (Figur 11). Med 8 år uten bruk av stoffene hadde det vært naturlig å forvente et fravær av resistens, da både for organofosfat og pyretroid. Resultatene viser derimot at 4% av lusen er resistent mot organofosfat og 35% mot pyretroid (Figur 10). Tilstedeværelsen av mutasjoner i populasjonen er påfallende med tanke på det lange fraværet. Risikoen for kontaminering fra Gudmundset anses som til stede, men lav. BarentsWatch har imidlertid registrert bruk av organofosfatet

azamethiphos til avlusning i 2021 og i 2019 på Jurvika og Myrane (Vedlegg 3, Vedlegg 4). Siden anleggene mest sannsynlig deler lusepopulasjon, som følge av utskiftningen av vannmassene (Vedlegg 2), vil en behandling og en eventuell resistensutvikling på et anlegg kunne påvirke de andre.

Innrapporteringer (BarentsWatch, 2022) i regionen viser altså en gjeninnføring av medikamenter hvor det tidligere er blitt registrert omfattende resistensutvikling. Våre prøver fra anleggene viser en klar motstandsdyktighet mot pyretroider, men et mer moderat resultat rundt organofosfat. Dette kan være grunnlaget for en avventende bruk av pyretroider på anleggene. Ingen nærliggende anlegg, som ikke har fritak fra luserapportering, har brukt pyretroider siden 2016 (BarentsWatch, 2022). Deltamethrin ble sist brukt på Gudmundset i 2016. Azamethiphos ble som sagt brukt på stedet i 2021, men hadde før denne avlusningen en pause på 5 år (Figur 11).

Vedlegg 1 og Tabell 1 viser en innføring av emamectin benzoate samtidig med azamethiphos, men et totalt fravær av hydrogenperoksid og deltamethrin siden 2016. Utvikling av resistens gir en periodevis bruk av kjemikalier. Kjemikalier med nedsatt effekt ser en nedgang i bruk. Bruken tas så opp igjen i løpet av 5-7 års tid når den aktuelle resistensen er borte. Dette stiller imidlertid spørsmål rundt hvordan prøvene viser resistens mot organofosfat etter kun et års bruk.

Tilstedeværelsen av resistens kan skyldes kontaminering av lakselus fra andre anlegg som har tatt i bruk behandling med aktuelle kjemikalier. Men dette åpner samstundes for at resistensgenet kan ha ligget latent i genomet, for å nå komme til uttrykk. Dersom mutasjonsgenet ligger latent, vil DNA-sekvensen være inaktiv. Ved en gjenopptaking av kjemiske avlusningsmetoder vil mutasjonsgenet bli uttrykt etter kort tid (Moody and Basten, 1990). Forrige periode med betydelig bruk av azamethiphos fra 2009 til 2016, altså et spenn på 7 år (Tabell 1). Hvis genet har ligget latent, og blir uttrykt som resistent, gir dette grunnlag for å anta en relativt kort periode hvor det ses en vesentlig effekt av middelet.

I perioden mellom 2014 til 2017 var det en liten nedgang i bruken av kjemisk behandling mot lakselus. Fra 2017 har nivået vært relativt stabilt, men med en liten økning igjen i 2021. Veterinærinstituttets resistenstesting i 2021 viste at det fremdeles var et høyt resistensnivå hos lakselusen ved bruk av medikamentelle behandlinger. Resultatene viste også en økt toleranse mot ferskvannsbehandling i områder der dette var hyppig brukt. For pyretroidet deltamethrin og organofosfatet azamethiphos, viste trenden derimot en liten nedgang i resistens mot stoffene. Dette til tross for en økt bruk av azamethiphos de siste tre årene (Helgesen *et al.*, 2022). Våre

kilder nevner ikke noe om mengden som blir brukt på de ulike anleggene ved hver behandling, kun den årlige mengden nasjonalt. Det kan altså ikke utelukkes bruk av høyere konsentrasjoner på enkelte anlegg for å nå en ønsket effekt.

### 4.3 Veien videre

Lakselus er og blir et stort problem. Kostnader av samtlige lusebehandlinger estimeres til 9,17 kr pr HOG som utgjør den største posten under andre driftskostnader (Kalager and Hellen, 2018). Nye konsepter som landbasert oppdrett og havmerder med behandlingsfri drift kommer, men innføring i stor skala tar tid. Utviklingen er heller ikke problemfri. Oppdrett på land er svært dyrt tenkt i laks pr kubikkmeter og havmerder som Nordlaks havfarm måtte nylig ta i bruk kitinhemmeren teflubenzuron (Bøhren, 2020). Ventede resultater fra nye konsepter er altså til dels ufullstendige, og en stabil behandlingsfri drift er ikke oppnådd i vesentlig skala. Næringen vil etter alle tegn fortsette å være avhengig av ulike avlusningsmetoder i nærmeste fremtid, og da også kjemiske metoder. Motstandsdyktighet er ikke kun et fenomen i kjemisk avlusning. Testing av lakselus ved anlegg med hyppig bruk av ferskvannsbad viser en økende osmotisk toleranse (Mattilsynet, 2022) og anlegg med rensefisk registrerer økte forekomster av blank lus (Harasimczuk, Øvergård and Tørud, 2021). Seleksjonstrykket en avlusning medfører kan bidra til et mangfold av mutasjoner. Det ses nå en gjeninnføring av allerede vidt brukte kjemiske grupper der tidligere resistensutvikling er godt dokumentert. Den aktuelle undersøkelsen har bekreftet tilstedeværelse av resistens for pyretroider og mest sannsynlig organofosfat. Tegn til resistens mot organofosfat har vært lave de siste årene, men lakselusen ser ut til å ha en særdeles kjapp resistensutvikling mot middelet. Pyretroider på sin side har ikke blitt gjeninnført ved anleggene omtalt i denne undersøkelsen. Det er naturlig å anta en tilbakeholdenhet grunnet tilstedeværelsen av resistens på begge anleggene. Effekten ved en gjeninnføring vil altså mest sannsynlig være lav, og frarådes. Resistensutviklingen hos organofosfat bør kartlegges videre og en vurdering tas med sikker data. Gitt et tenkt fremtidig fravær av resistens mot begge midlene, bør gjeninnføringen skje i kombinasjon med flere medikamenter som kan rulleres. En varierende bruk kan hindre en ny rask fremvekst av resistens, men dette krever en sammensatt og systematisk bruk felles for alle anlegg der nok medikamenter kan rulleres. Det har gått 10 år siden et nytt medikament sist kom på det norske markedet. Benchmarks ectosan brukes på brønnbåt og påstås av produsenten å ha en opp mot 100% effekt (Evans, 2018). Dette kan være mulig med en lukket og kontrollert behandling fra innføring. Hvis imidlertid individer skulle overleve i enkelte behandlinger vil vi mest sannsynlig se en fremvekst av resistente populasjoner. Hverken pyretroider eller organofosfat

har hatt denne muligheten. Hvis ingen lus overlever, kan ikke resistens utvikles. Om Ectosan opprettholder en opp mot 100% effekt, eller ender som tidligere midler, vil tiden vise.

## 5. Konklusjon

Lakselus, *Lepeophtheirus salmonis*, har vært et stort problem i oppdrettsnæringen i flere tiår. Ved utvikling av resistens mot kjemisk behandling mot organofosfat på tidlig 90-tallet, pyretroid på sent 90-tallet og emamectin benzoate på tidlig 2000-tallet, har lakselus tømt havbruksnæringens verktøykasse og medført enorme kostnader. Dette studiet har undersøkt om lakselus fortsatt viser en trend til resistens mot pyretroid og organofosfat, selv etter flere år uten bruk av stoffene. Viktigheten av å undersøke tilstedeværelse av resistens er stor. Hvis en resistens vaskes ut, kan det argumenteres for en gjeninnføring av det aktuelle kjemikaliet hvis nytteverdien er til stede.

Resultatene diskutert i oppgaven gir en indikasjon på en vedvarende tilstedeværelse av resistens mot både pyretroid og organofosfat. Analysene forteller at det selv med kun et års bruk kan finnes resistens mot organofosfat i lakselus. Ulike populasjoner viser en trend til ulik resistensutvikling. I områder, som regel i Nord-Norge og på Vestlandet hvor oppdrett er en stor næring, viser det seg at resistensen er høyere enn på eksempelvis Sørlandet hvor oppdrett ikke er like utbredt. Å undersøke strømsystemer inn og ut av fjorder, og plassere anlegg i områder hvor smitte fra nærliggende fjorder er lite sannsynlig, kan en redusere risikoen for spredning av resistent lakselus. Videre kan det oppfordres til å ikke gjeninnføre bruk av pyretroid da lakselus fortsatt viser en trend til høye resistens-nivåer. Utdypende tester om resistens mot organofosfat og kartlegging av resistensutviklingen anbefales før det besluttes å ta i bruk stoffet. Resultatene viser også tegn til resistens mot organofosfat. Organofosfat blir brukt i dag og bruken, med potensialet for videre resistensutvikling, bør oppfølges. I og med at det kun ble analysert 36 lus, vil ikke det gi et godt grunnlag for å forklare trenden til resistens. Men ved å sammenligne resultatene med historisk data kan vi anta at det er en vedvarende pyretroid-resistens, mens det har skjedd en reduksjon i resistens mot organofosfat. Dette til tross for et 6 års fravær av pyretroider på Gudmundset og 8 år på Dryna.

## Referanser

- Aaen, S.M. *et al.* (2015) "Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture," *Trends in Parasitology*, 31(2), pp. 72–81. doi:10.1016/j.pt.2014.12.006.
- Amundsen, B. (2022) *Norsk fiskeoppdrett har «betydelige utfordringer», ifølge ny rapport*, <https://forskning.no/fiskehelse/norsk-fiskeoppdrett-har-betydelige-utfordringer-ifolge-ny-rapport/1994153>.
- Aslam, B. *et al.* (2018) "Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis," *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, pp. 1645–1658. doi:10.2147/IDR.S173867.
- Baklien, A.T. (2020) *Nok et rekordår i oppdrettsnæringen*, <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/nok-et-rekordar-i-oppdrettsnaeringen>.
- BarentsWatch (2022) *Fiskehelse*, <https://www.barentswatch.no/fiskehelse/>.
- Berg, T. (2017) *Slik fungerer avlusninga - og så mye koster den å utføre*, <https://ilaks.no/slik-fungerer-avlusninga-og-sa-mye-koster-den-a-utfore/>.
- Bøhren, L. (2020) *Raser mot kjemikaliebruk på Havfarmen: – Spiller russisk rulett*, <https://e24.no/hav-og-sjoemat/i/GaP1eV/raser-mot-kjemikaliebruk-paa-havfarmen-spiller-russisk-rulett>.
- Boxaspen, K. *et al.* (2017) *Miljø. Lakselus, betydning, problem og behandling. Hvor mye havbruk tåler norskekysten? Genetiske interaksjoner*.
- Bredal, W., Vågen, I. and Reinnel, H. (2000) *Behandling mot lakselus i oppdrettsanlegg*, SLK-publikasjon. Oslo.
- Brun, E. *et al.* (2022) *Fiskehelse rapporten 2021 Veterinærinstituttet 2*. Available at: [www.vetinst.no](http://www.vetinst.no).
- Dalvin, S. (2020) *Generell biologi*, <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/generell-biologi>.
- Dalvin, S. and Oppedal, F. (2019) "Utvikling av lakselus ved ulike temperatur og lys," *Rapport fra havforskningen*, 13.
- Dyrevernalliansen (2021) *Mattilsynet avlyser varslet forbud mot termisk avlusning*, <https://kommunikasjon.ntb.no/pressemelding/mattilsynet-avlyser-varslet-forbud-mot-termisk-avlusning?publisherId=5050259&releaseId=17905773>.
- Fagerbakke, C. (2020) *Dette er trafikklyssystemet*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2020/februar/trafikklys>.
- Fjørtoft, H.B. *et al.* (2021) "Losing the 'arms race': multiresistant salmon lice are dispersed throughout the North Atlantic Ocean," *Royal Society Open Science*, 8(5), p. 210265. doi:10.1098/rsos.210265.
- Fjørtoft, H.B. (no date) *Resistent lakselus*. Ålesund. Available at: <https://lakseelver.no/news-2015/en-dodelig-parasitt>.
- Fossum, S. and Dissen, E. (2021) *PCR (polymerasekjedereaksjon)*, [https://sml.snl.no/PCR\\_-\\_polymerasekjedereaksjon](https://sml.snl.no/PCR_-_polymerasekjedereaksjon).

- Gismervik, K. et al. (2017) *Mekanisk avlusing med FLS-avlusersystem-dokumentasjon av fiskevelferd og effekt mot lus*, Veterinærinstituttets rapportserie. Oslo.
- Gismervik, K. et al. (2019) *Foreløpig oppsummering på bestilling: Vurdering av termisk avlusing*. Available at: <https://kommunikasjon.ntb.no/data/attachments/00748/6d958b89-eedd-4770-8453-e2c67dee7307.pdf>.
- Gjerdrum, C.W. (2020) *Oppdrettslaksen kveles av varmere hav*, <https://forskning.no/fisk-fiskehelse-hav-og-fiske/oppdrettslaksen-kveles-av-varmere-hav/1681682>.
- Harasimczuk, E., Øvergård, A.-C. and Tørud, B. (2021) "Kan lakselusen kamuflere seg for rensefisken - pigmentering og resistensutvikling," *Norsk Fiskeoppdrett*, 3, pp. 44–45.
- Havforskningsinstituttet (2018) *Resistens hos lakselus*, <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/resistens-hos-lakselus>.
- Helgesen, K.O. et al. (2017) *The surveillance programme for resistance to chemotherapeutants in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2016*.
- Helgesen, K.O. et al. (2022) *The surveillance programme for resistance in salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) in Norway 2021, Surveillance program report*. Available at: [www.vetinst.no](http://www.vetinst.no).
- Helgesen, K.O., Jansen, P. and Horsberg, T.E. (2018) *Emamektin benzokat mot lakselus-Forbruk og behandlingsstrategier vurdert med tanke på resistens*. Available at: [https://www.legemiddelsok.no/\\_layouts/15/Preparatomtaler/Spc/1999-04254.pdf](https://www.legemiddelsok.no/_layouts/15/Preparatomtaler/Spc/1999-04254.pdf).
- Hoddevik, B. and Press, M. (2019) *Smertefullt med avlusing i varmt vann*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2019/mars/smertefullt-med-avlusing-i-varmt-vann>.
- Kalager, F.S. and Hellen, T. (2018) *Kostnader knyttet til behandling mot lakselus i norsk havbruksnæring*. Master's thesis. Universitetet i Stavanger.
- Karlsen, Ø. (2019) *Effekter av lakselus på vill laksefisk*, <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/lakselus/effekter-av-lakselus-pa-vill-laksefisk>.
- Karlsen, Ø. et al. (2020) *KUNNSKAPSSTATUS LAKSELUS 2020 Effekt av lakselus på vill laksefisk (2010-2019)*.
- Kaur, K. et al. (2015) "Mechanism behind Resistance against the Organophosphate Azamethiphos in Salmon Lice (Lepeophtheirus salmonis)," *PLOS ONE*, 10(4), p. e0124220. doi:10.1371/journal.pone.0124220.
- Kierulf, P. (2018) *Bioassay*, <https://sml.snl.no/bioassay>.
- Langdalen, A. (2020) *DNA*, <https://snl.no/DNA>.
- Legemiddelbruk i oppdrettsnæringen* (2018). Available at: [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/legemidler\\_til\\_fisk/sluttrapport\\_-\\_mattilsynets\\_tilsyn\\_med\\_legemiddelbruk\\_i\\_oppdrettsnaeringen\\_20152017.31171/binary/Sluttrapport%20-%20Mattilsynets%20tilsyn%20med%20legemiddelbruk%20i%20oppdrettsn%C3%A6ringen%202015-2017](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/legemidler_til_fisk/sluttrapport_-_mattilsynets_tilsyn_med_legemiddelbruk_i_oppdrettsnaeringen_20152017.31171/binary/Sluttrapport%20-%20Mattilsynets%20tilsyn%20med%20legemiddelbruk%20i%20oppdrettsn%C3%A6ringen%202015-2017).
- Mæland, R.B. (2020) *Studie: - Rensefisk ingen universalkur mot lakselus*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2020/mars/rensefisk-ingen-universalkur-mot-lakselus>.

Mattilsynet (2016) *Fakta om lakselus og lakselusbekjempelse*, [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/fiske\\_og\\_skjellsykdommer/lakselus/fakta\\_om\\_lakselus\\_og\\_lakselusbekjempelse.23766](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/fakta_om_lakselus_og_lakselusbekjempelse.23766).

Mattilsynet (2022) *Resistenstesting mot legemidler og ferskvann hos lakselus 2021*, [https://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskehelse/fiske\\_og\\_skjellsykdommer/lakselus/resistenstesting\\_mot\\_legemidler\\_og\\_ferskvann\\_hos\\_lakselus\\_2021.46186](https://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskehelse/fiske_og_skjellsykdommer/lakselus/resistenstesting_mot_legemidler_og_ferskvann_hos_lakselus_2021.46186).

Moody, M.E. and Basten, C.J. (1990) "The evolution of latent genes in subdivided populations.," *Genetics*, 124(1), pp. 187–197. doi:10.1093/genetics/124.1.187.

Naturvernforbundet (2020) *Oppdrett*, <https://naturvernforbundet.no/oppdrett/>.

Nilsson, J. *et al.* (2019) "Sudden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon," *Veterinary and Animal Science*, 8, p. 100076. doi:10.1016/j.vas.2019.100076.

Øvergård, A.-C. and Hamre, L.A. (2020) "Lakselus/vert-interaksjoner," *Naturen*, 144(5), pp. 199–206. doi:10.18261/issn.1504-3118-2020-05-08.

Overton, K. *et al.* (2019) "Salmon lice treatments and salmon mortality in Norwegian aquaculture: a review," *Reviews in Aquaculture*, 11(4), pp. 1398–1417. doi:10.1111/raq.12299.

Pettersen, V.L. (2021) *Tiltak mot lakselus mer effektivt enn først antatt*, <https://www.hi.no/hi/nyheter/2021/juni/tiltak-mot-lakselus-mer-effektivt-enn-forst-antatt>.

Poppe, T.T. *et al.* (2018) "Termisk behandling av laks," *Norsk veterinærtidsskrift*, 130(nr 3), pp. 148–156.

Regjeringens Havstrategi (2017) *Ny vekst, stolt historie Regjeringens havstrategi*. Available at: [file:///Users/45aasola/Downloads/nfd\\_havstrategi\\_uu.pdf](file:///Users/45aasola/Downloads/nfd_havstrategi_uu.pdf).

Statistisk sentralbyrå (2020) *Akvakultur (avsluttet i Statistisk sentralbyrå)*, <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>.

Stene, A., Gansel, L. and Jansen, M.D. (2018) "Sluttrapport Strategier for å begrense spredning av virus mellom sjølokaliteter med laksefisk – fokus på Salmonid Alphavirus (SAV) og Pancreas Disease (PD)," *FHF prosjekt: 901005* [Preprint].

Thermo Fisher (2014) *Real-time PCR handbook*.

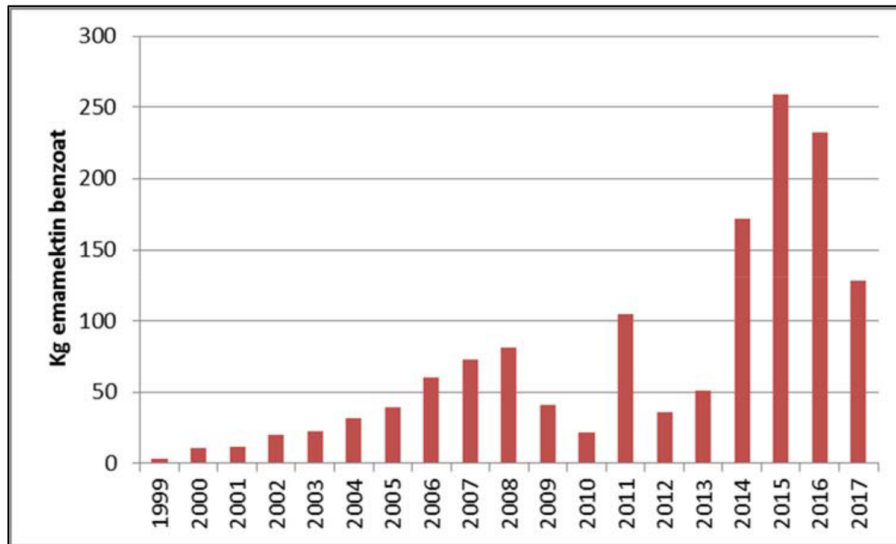
Veterinærinstituttet (no date) *Lakselus*, <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/lakselus>.



# Vedlegg

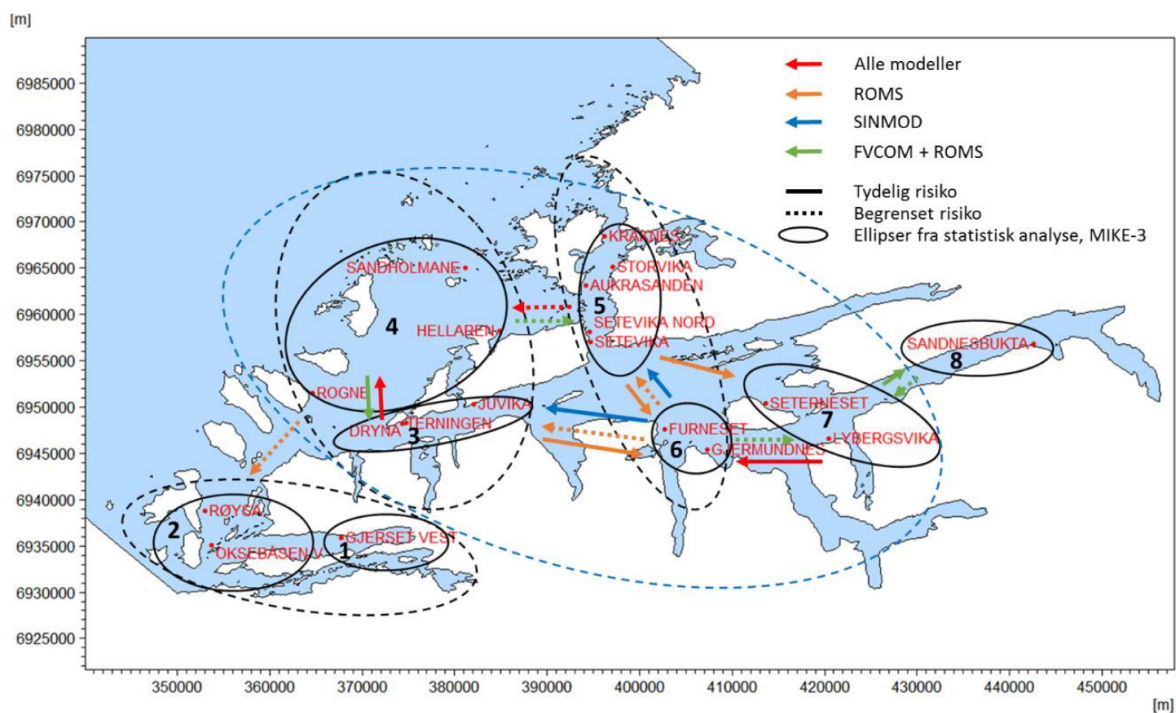
## Vedlegg 1

Innrapportert salg av kilo Emamectin benzoat Folkehelseinstituttet (Helgesen, Jansen and Horsberg, 2018).



## Vedlegg 2

Resultater fra modellene for havstrøm og virusspredning kombineres. Sterk sirkel betyr stor kontakt (gjensidig), stiplet sirkel vil si at det er mindre sannsynlig, men det er kontakt. Blå sirkel vil si at det potensielt er kontakt.



## Vedlegg 3

Tiltak mot lakselus Juvika. Anlegget ligger i samme fjord som Dryna.

17	2022	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
37	2021	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
27	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
25	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
24	2021	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				delers av lok	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
36	2020	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1506	MOLDE	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
43	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
37	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
30	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2018	12260	Juvika	mekanisk fjerning					delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
39	2017	12260	Juvika	rensefisk		1694	Grøngylt	601	hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2017	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
25	2017	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				delers av lok	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
37	2016	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
29	2016	12260	Juvika	mekanisk fjerning					hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
15	2016	12260	Juvika	medikamer badebehan	Hydrogenperoksid				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
38	2015	12260	Juvika	rensefisk		1694	Grøngylt	1500	hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
27	2015	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2015	12260	Juvika	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
28	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
28	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
26	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
14	2014	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
46	2013	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
45	2013	12260	Juvika	medikamer badebehan	Deltamethrin				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66477	6,696767	5	Stadtil Hustadvika
35	2013	12260	Juvika	rensefisk		1693	Bergnebb	2500	hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66345	6,696519	5	Stadtil Hustadvika
6	2013	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66345	6,696519	5	Stadtil Hustadvika
16	2012	12260	Juvika	medikamer badebehan	Azamethiphos				hele lokalit	1545	MIDSUND	15	Møre og R	62,66345	6,696519	5	Stadtil Hustadvika

## Vedlegg 4

Tiltak mot lakselus Myrane. Anlegget ligger i samme fjord som Dryna.

14	2022	27215	Myrane	medikamer badebehan	Annet virkestoff				delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
52	2021	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
50	2021	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
37	2021	27215	Myrane	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
36	2021	27215	Myrane	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
35	2021	27215	Myrane	medikamer forbehandl	Emamectin benzoat				hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
40	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
31	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
27	2019	27215	Myrane	medikamer badebehan	Azamethiphos				delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
27	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
7	2019	27215	Myrane	mekanisk fjerning					hele lokalit	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
24	2018	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
23	2018	27215	Myrane	mekanisk fjerning					delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika
9	2018	27215	Myrane	rensefisk		222120	Rognkjeks (	2375	delers av lok	1535	VESTNES	15	Møre og R	62,6505	6,726683	5	Stadtil Hustadvika

