

# ALVELD HOS LAM

KAN VI FOREBYGGE SJUKDOMMEN?

## Forfattere:

Kristin Sørheim, Emma Brunberg, Lise Grøva, Unni Støbet Lande, Marianne Lilletvedt Tovsen, Krister Gjestvang Grønlien, Hanne Hjorth Tønnesen, Jan Karlsen, Olav Skulberg, Ivar Mysterud.

**TITTEL/TITLE**

ALVELD HOS LAM – KAN VI FOREBYGGE SJUKDOMMEN?

**FORFATTER(E)/AUTHOR(S)**

KRISTIN SØRHEIM, EMMA BRUNBERG, (NORSØK), LISE GRØVA, UNNI STØBET LANDE, (NIBIO) MARIANNE LILLETVEDT TOVSEN, KRISTER GJESTVANG GRØNLIE, HANNE HJORTH TØNNESEN, JAN KARLSEN (UIO- FARMSØYTISK INSTITUTT), IVAR MYSTERUD (UIO- INSTITUTT FOR BIOVITENSKAP), OLAV SKULBERG (NIVA).

DATO/ DATE:	RAPPORT NR./ REPORT NO.:	TILGJENGELIGHET/ AVAILABILITY:	PROSJEKT NR./ PROJECT NO.:	SAKSNR./ ARCHIVE NO.:
30.06.2016	VOL. 1/NR 4/2016	ÅPEN	30003,30004	ARKIVNR
ISBN-NR./ISBN-NO:	ISBN DIGITAL VERSJON/ ISBN DIGITAL VERSION:	ISSN-NR./ISSN-NO:	ANTALL SIDER/ NO. OF PAGES:	ANTALL VEDLEGG/ NO. OF APPENDICES:
ISBN 978-82-8202-021-3	VERSJON NR	ISSN NR	36	1

**OPPDRAUGSGIVER/EMPLOYER:**REGIONALT FORSKNINGSFOND MIDT-NORGE,  
LANDBRUKSDIREKTORATET**KONTAKTPERSON/CONTACT PERSON:**

EMMA BRUNBERG

**STIKKORD/KEYWORDS:**SAU, ALVELD, FORGIFTNING  
SHEEP, YELLOWSES, INTOXICATION**FAGOMRÅDE/FIELD OF WORK:**DYREVELFERD, VETERINÆRMEDISIN, FARMASI, BIOLOGI  
ANIMAL WELFARE, VETERINARY MEDICIN, PHARMACY,  
BIOLOGY**SAMMENDRAG/SUMMARY:**

Norsk senter for økologisk landbruk (NORSØK) og Universitetet i Oslo ved Farmasøytisk Institutt og Institutt for biovitenskap har gjennomført et arbeid for å skaffe mer kunnskap om årsaken til sjukdommen alveld hos lam på beite og undersøke muligheten for å finne forebyggende tiltak som kan hindre opptak av giftstoffer som framkaller sjukdommen. Andre samarbeidspartnere i prosjektet har vært NIVA, NIBIO og representanter for landbruksnæringa. Prosjektene har vært finansiert av Landbruksdirektoratet, Regionalt forskningsfond Midt-Norge, Fylkesmannen i Sogn og Fjordane, Fylkesmannen i Møre og Romsdal, Møre og Romsdal fylkeskommune.

En spørreundersøkelse blant saueholdere i Sogn- og Fjordane, Møre og Romsdal, Sør-Trøndelag og Hedmark viser at dødsårsaken hos lam på beite varierer mellom fylkene, og at dette er særlig tydelig når det gjelder alveld. Et annet hovedfunn er at en stor del av tapet av lam på utmarksbeite klassifiseres som «andre sjukdommer» eller «annet», altså at vi ikke har sikker kunnskap om tapsårsak. Forekomsten av alveld varierer mye fra år til år, men 31,7% av produsentene som deltok i spørreundersøkelsen hadde ett eller flere år mistet dyr pga alveld, noe en vurderer som en relativt høg prosentandel. Alveld var vanligst i Nord-Trøndelag, Møre og Romsdal og Sør-Trøndelag, der mellom 22% og 39% hadde mistet lam på grunn av alveld i 2014.

Sjukdommen alveld skyldes påvirkning av ett eller flere levertoksiske stoffer. Cyanobakterier av artene *Stigonema* og *Symplocastrum* er analysert med hensyn på cyanotoksiner etter at de er satt i sammenheng med påvisning av

sjukdommen i et utsatt beiteområde i Halså kommune i Møre og Romsdal. Identifisering og karakterisering av toksiner fra de aktuelle artene er utført i samarbeid med laboratorier i Bad Elster, Tyskland og Trebon, Tsjekkia. Analysearbeidet er ikke endelig slutført.

Ett delmål i prosjektet var – på bakgrunn av hypotesen om at det er forekomst av ett eller flere levertoksiske stoffer som forårsaker sykdom - å finne en egna form, størrelse og vekt på en bolus som senere kan utvikles til å inneholde toksinfellende kjemikalier og slik kunne bidra til å ta hånd om giftstoffene i fordøyelseskanalen før de kommer over i blodet og forårsaker fysiologisk skade på dyret. Testbolus i tre ulike størrelser (3, 3,5 og 4 cm lengde) er produsert og testa på 6 lam på ca 2 mnd (vekt 16-22 kg). Bolus var lett å gi med en standard applikator som brukes til parasittmiddel. Røntgenfotografering av lamma viste at alle bolusene lå fint plassert i nettmagen etter at de var lagt inn. Oppholdstid på bolus i nettmagen var ca 4 uker, noe vi mener er tilstrekkelig til å være virksomme i den kritiske perioden for utvikling av avveid på utmarksbeite. Bolusene gjorde ikke skade på fordøyelseskanalen. Tilvekst på lamma som fikk bolus var ikke signifikant forskjellig fra ei kontrollgruppe. Vekt og størrelse på bolusene var hensiktsmessige og kan legges til grunn for videre arbeid.

Et annet delmål i prosjektet var å undersøke potensialet til polykationet chitosan som et mulig utfellingsreagens for saponiner som blant annet finnes i romeplanten. Den produserte bolusen ga en kontrollert frisetting av chitosan over tid, avhengig av diameteren på åpningen i lokket på bolusen. Frisettingshastigheten kan derved kontrolleres ved å endre diameteren på åpningen. Det ble sett en tydelig utfelling ved tilsetning av en løsningsmiddel med saponiner til en løsningsmiddel med chitosan. Prosjektet har undersøkt og fått bekrefta muligheten for å bruke chitosan som et toksinfellende middel som kan frigis over tid fra en bolus i dyrets fordøyelseskanal.

Arbeidet har gitt viktig ny kunnskap og er en nødvendig start på et større og mer omfattende arbeid for å se om vi kan utvikle forebyggende tiltak som i praktisk husdyrhold gir resultater i form av mindre tap, bedre dyrevelferd og bedre økonomi.

LAND/COUNTRY:

NORGE/NORWAY

FYLKE/COUNTY:

MØRE OG ROMSDAL/MØRE AND ROMSDAL

KOMMUNE/MUNICIPALITY:

TINGVOLL

STED/LOKALITET:

TINGVOLL GARD

GODKJENT /APPROVED

TURID STRØM

NAVN / NAME



PROSJEKTLEDER /PROJECT LEADER

EMMA BRUNBERG

NAVN / NAME

# Forord

Norsk senter for økologisk landbruk (NORSØK) har ledet et arbeid for å skaffe mer kunnskap om årsaken til sjukdommen alveld hos lam på beite samt undersøke muligheten for å finne forebyggende tiltak som kan hindre opptak av giftstoffer som framkaller sjukdommen. Arbeidet er finansiert gjennom bevilgning til et kvalifiseringsprosjekt fra Regionalt forskningsfond Midt-Norge og et utredningsprosjekt finansiert av jordbruksavtalemidlene gjennom Landbruksdirektoratet. I tillegg har Fylkesmannen i Sogn og Fjordane, Fylkesmannen i Møre og Romsdal og Møre og Romsdal fylkeskommune gitt økonomiske bidrag til prosjektet.

Samarbeidspartnere i prosjektet har vært Universitetet i Oslo ved Farmasøytisk Institutt og Institutt for biovitenskap, NIVA, NIBIO og representanter for landbruksnæringa, slik som Norsk Sau og Geit, Norsk Landbruksrådgivning og Grønn Forskning Midt-Norge. Takk også for bidrag fra professor Steinar Waage ved NVH og veterinær Nils Arild Sæther for bistand med røntgenfotografering i felt.

Arbeidet har gitt viktig ny kunnskap og er en nødvendig start på et større og mer omfattende arbeid for å se om vi kan utvikle forebyggende tiltak som i praktisk husdyrhold gir resultater i form av mindre tap, bedre dyrevelferd og bedre økonomi.

NORSØK takker for økonomisk støtte fra alle bidragsyterne og samarbeidspartnerne for godt arbeid.



Foto: Kristin Sørheim

Tingvoll – 30.06.2016

Turid Strøm, Daglig leder NORSØK

# Innhold

Forord.....	4
Innhold .....	5
Innledning .....	6
Om sjukdommen alveld.....	6
Forebygging av sjukdommen.....	7
Andre toksinbetinga sjukdommer .....	7
Prosjektorganisering.....	8
Spørreundersøkelse .....	9
Metode .....	9
Resultater .....	9
Respondenter.....	9
Vårsesongen.....	9
Sommeresongen .....	11
Høstsesongen.....	12
Annet.....	14
Diskusjon .....	14
Bolusutforming .....	15
Metode .....	15
Resultater .....	17
Utforming av bolus .....	17
Testing av bolus på lam.....	21
Diskusjon .....	24
Toksinkarakterisering.....	25
Metode .....	25
Kulturteknisk del .....	25
Resultater .....	27
Observasjoner og tolkninger.....	27
Diskusjon.....	27
Felling av toksiner in vitro .....	27
Metode .....	28
Kvantifisering av chitosan i løsning.....	29
Frisetting av chitosan fra bolus i «simulert sauemage».....	29
Flokkulering og utfelling av saponiner med chitosan .....	30
Resultater .....	30
Flokkulering og utfelling av saponiner med chitosan .....	32
Diskusjon .....	32
Konklusjon.....	33
Publisering fra prosjektet.....	34
Vitenskapelige publikasjoner:.....	34
Populærvitenskapelig formidling:.....	34
Foredrag.....	34
Artikler i fagblad.....	34
Powerpoint-presentasjon -sammendrag.....	34
Litteraturreferanser .....	35
Vedlegg 1.....	39
Spørreundersøkelse .....	39

# Innledning

Det er et mål å øke norsk matproduksjon basert på norske ressurser. Utmarksfôret som i dag høstes av norske beitedyr tilsvarer grasproduksjonen på ca. 1 million dekar innmark. Utmarks-beiting med sau og storfe har et stort potensiale, anslått til over 600 mill fôrenheter (Bioforsk Fokus 13 (2) Rekdal). Dette kan teoretisk redusere bruken av importert kraftfôr med 600 mill kg og kan dermed ha en verdi på ca 2 mrd kroner. Det er et stort potensiale for økt produksjon av sauekjøtt på lokale ressurser. Stortinget har satt et mål om 15 % økologisk produksjon og forbruk innen 2020. En nylig avgitt rapport fra Riksrevisjonen viser at vi er langt fra å nå dette målet, og at virkemiddelbruken ikke har vært målretta og sterk nok. Omlegging til økologisk sauehold har et uutnytt potensiale. Målet i ei økologisk driftsform er at saueholdet skal greie seg mest mulig med gårdens egne, lokale og fornybare ressurser. Beite og konservert grovfôr dyrka etter økologiske prinsipper er de viktigste fôrmidlene. God dyrevelferd og vektlegging av forebyggende tiltak er vesentlig. En av de største utfordringene for økologisk saueproduksjon er tilgang til nok grovfôr. Derfor er det enda mer avgjørende for økologisk produksjon å kunne nytte tilgjengelig utmarksbeite (Ebbesvik et al., 2012).

I 2013 ble det til sammen søkt erstatning for tap av om lag 2700 sau og lam, hvor det ikke ble sannsynliggjort at tapet kunne knyttes til fredet rovvilt, og det ble utbetalt 2 mill kroner i erstatning. Størst andel av erstatningene gikk som tidligere år til gårdbrukere i Møre og Romsdal og Sogn og Fjordane, men også Trøndelagsfylka, Nordland og Hordaland hadde store tap. Erstatningsordninga for tap av lam som ikke kunne knyttes til fredet rovvilt ble avvikla fra 2014.

Det store tapet av sau og lam på utmarksbeite er en etisk utfordring når det gjelder dyrevelferd og er en flaskehals for å utnytte ressursene i utmarka til matproduksjon og skjøtsel av kulturlandskapet. "Utredning - kunnskapsgrunnlag for forskning på husdyrproduksjon" (UMB, 2012), påpeker et behov for bedre kunnskap om tapsårsaker og tiltak som kan forebygge tap av dyr på beite. Sjukdommen alveld er antatt å være en varierende, men svært viktig tapsårsak i småfenæringa på utmarksbeiter i kystnære områder. Per i dag finnes ingen effektive forebyggende tiltak mot alveld.

Norsk senter for økologisk landbruk har fått støtte fra Landbruksdirektoratet til prosjektet «Forebyggende tiltak mot alveld – forprosjekt» og fra Regionalt forskningsfond Midt-Norge til kvalifiseringsprosjektet «Forebyggende tiltak mot alveld hos lam». Hovedmålet med begge prosjekta er å undersøke om og hvordan en kan utvikle forebyggende tiltak mot sjukdommen alveld hos lam. Denne rapporten oppsummerer aktiviteter og resultater fra begge prosjekta.

## Om sjukdommen alveld

Alveld er en sjukdom hos lam som karakteriseres av oppsvulmet ansikt og overfølsomhet for lys (fotosensibilisering).

Sjukdommen oppstår ved at «ukjente» toksiner gir leverskade. Dette fører til opphoping av fylloerythrin, et nedbrytningsprodukt av klorofyll, i kroppen. Fylloerythrin er fotosensibiliserende og skilles i friske dyr normalt ut i gallen. Når utskillinga svikter, kan fylloerythrinet transporteres ut i dyrekroppen via blodbanene. Det medfører en fotosensitiv reaksjon og celledød i vev og kroppspartier der dyret i særlig grad utsettes for sollys, slik som i ansikt og øyne (Flåøyen, 2000). Skadene kan være livstruende for dyrene. Et tilsvarende sjukdomsforløp er beskrevet også for andre arter av drøvtyggere (Puschner, 1998).

Lignende symptomer er blant annet beskrevet på lam på høstbeite i kornåkrer som er treska (s.k. høstalveld).

På New Zealand og i Australia er lignende sjukdomsforløp beskrevet under navnet «facial eczema». Sjukdommen er forårsaka av mykotoxinet sporidesmin A, som kommer fra sekkesporesoppen *Pithomyces chartarum* (Morris et al., 2012; di Menna et al., 2009).

I Norge har en lenge antatt at sjukdommen henger sammen med inntak av romeplanten og forgiftning fra saponiner i romen (Flåøyen, 1993; Mysterud et al., 2007). Forskning på alveld har foregått i mange år her i landet. I beitesesongen 2007 ble det i et forsøk i Halså kommune på Nordmøre gjort funn av en biofilm med et konsortium av ulike mikroorganismer (Laane et al., 2008). Biofilmer er klynger og kollektiver av mikroorganismer som er fast forbundet, festet til en overflate og oftest innhyllet eller omgitt av en matrix av slim/glye (såkalte ekstracellulære polymeriske stoffer; EPS) (Skulberg & Mysterud, 2012). Biofilmer kan opptre i naturen i mange ulike typer (Mysterud, 2015). Blant artsinventaret i Halså-biofilmen ble det påvist mange arter av cyanobakterier, et funn som fikk stor betydning for den videre alvelforskningen (Mysterud et al., 2008 a, b, c; Mysterud & Laane, 2008; Laane et al., 2008). Mange cyanobakterier produserer giftstoffer, og det har vist seg at noen av disse er levertoksiske og kan føre til fotosensibilisering hos pattedyr (Carmichael, 1992; Namikoski & Rinehart, 1996). Cyanobakteriene kan utskille mye slim (glye) og er ofte viktige «arkitekter» i oppbygging av biofilmer (Mysterud, 2015). Biofilm kan utvikles i mange typer miljøer, også i rennende vann og sigevann på utmarksbeiter i Møre og Romsdal (Mysterud et al., 2008). Etter undersøkelser av blodserum hos lam med hensyn på kjemiske arter av reaktiv oksygen (ROS) (Tønnesen et al., 2010; Hegge et al., 2013), ble det utført en parallell undersøkelse av rennende vann i bekker og sig i det aktuelle beiteområdet (Tønnesen et al., 2012). Det ble påvist varierende forekomst av ROS, men i så lave konsentrasjoner at dette alene ikke kan forklare den fysiologiske tilstanden i lammene. Prosjektets alvelforskere arbeider nå ut fra to hypoteser: 1) "Hot spot"-hypotesen og 2) Beiting av biofilm-hypotesen (Mysterud et al., 2011 a, b, c). Begge hypotesene forutsetter at alvelsjukedommen utløses av at dyrene får i seg giftstoffer gjennom beiting i form av mat eller drikke.

Den første hypotesen går ut på at det i spesielle vannsamlinger, for eksempel under tørkeperioder, forekommer økt konsentrasjon av mulige giftstoffer fra cyanobakterier i dyrenes drikkevann (kjemiske "hot spots"). Den andre tar utgangspunkt i at dyrene regelrett beiter biofilm og/eller rome som står i sigevann (såkalt «vassrome») og får i seg toksiner fra cyanobakterier og/eller saponiner på den måten.

Det er fortsatt ikke fullt ut avklart hvilke organismer og hvilke kjemiske stoffer som framkaller sjukdommen, men det fokuseres på arter som er potensielt giftige. Da mikrobiomet i biofilmen ble oppdaget, var det helt ukjent at det fantes giftige cyanobakterier på utmarksbeiter i myr og kysthei så høyt oppe i den alpine sonen. Dette nødvendiggjorde et parallelt kartleggingsarbeid på cyanobakterienes biologi som må betegnes som ren grunnforskning (Skulberg & Mysterud, 2012; Skulberg et al., 2012; Skulberg, 2013). Forskingen er nå konsentrert om å slutføre analysearbeid i laboratoriet for å være sikker på hvilke mikroorganismer og toksiner som er ansvarlige for sjukdommen, som grunnlag for å utvikle strategier for forebyggende tiltak.

## Forebygging av sjukdommen

Per i dag finnes det ikke forebyggende tiltak mot sjukdommen alveld. Dersom en gjennom regelmessig og hyppig tilsyn oppdager sjukdommen med det samme den oppstår eller svært tidlig i sjukdomsforløpet, kan en ta ned dyra fra beite og sette dem på et mørkt sted, skjerma fra sollys. Symptomatisk behandling med væske, ernæring, vitaminer, eventuelt antibiotika ved infeksjonstilstander og smertestillende midler er vanlig, likeens salver eller linimenter ved hudskader. Hvis sjukdommen ikke er kommet for langt og lever- og nyreskadene er for store, kan dyra bli friske. Tilveksten blir gjerne likevel nedsatt over lengre tid. Ofte blir ikke sjukdommen oppdaga i tide, dyra får store hudskader, gjenklistra øyne, og ender ofte opp med å gå seg på vannet eller til mørke kjølige steder der de kan bli liggende til de dør, eller de blir et lett bytte for rovdyr og kongeørn (Mysterud et al., 2003).

Arbeidshypotesen i dette forprosjektet er at effektive forebyggende tiltak mot alveld kan etableres når en etter slutført analysearbeid har karakterisert toksinet eller toksinene. Dette kan gjøre det mulig å utvikle kjemiske forbindelser som kan binde toksinene i fordøyelsessystemet slik at de ikke kommer over i blodet og får skadet dyrene fysiologisk.

## Andre toksinbetinga sjukdommer

Internasjonalt har det de senere år vært økende oppmerksomhet rundt sjukdommer hos dyr og mennesker som er forårsaka av giftstoffer fra sopp, alger og planter (Keeler & Tu, 1983; Carmichael, 1992; Huismann,

2005; Hudnell, 2008; Pitt, 2009). Et våtere og varmere klima gir bedre vilkår for ulike sopparter, bakterier og alger, med påfølgende risiko for toksinproduksjon i matvarer og fôrvarer.

Særlig oppmerksomhet har vært knytta til mykotoksiner (soppgifter), som er antatt å være en stor risiko for mattrygghet og utgjør et betydelig økonomisk tap i husdyrholdet flere steder i verden. Dette har ført til omfattende forskning for å analysere og karakterisere toksiner og for å utvikle tilsetningsstoffer i fôr og mat som kan binde toksiner. Alternative strategier er å administrere stoffer i kapsel- og bolusform for å binde eller nøytralisere disse toksinene. Når mattrygghet står på spill, åpner det seg store markeder for tiltak for å redusere risikoen for sjukdom, og det er allerede mange internasjonale firma som arbeider med å utvikle og selge denne type forebyggende stoffer. Dette har også ført til ny forskning på *in vivo* metoder for å avgjøre om fellingsstoffene virkelig har en forebyggende effekt og faktisk hindrer toksinene i å gå over i blodet og gjøre skade. De fleste dyreforsøk er gjort på kylling og gris, men det er også gjort forsøk på drøvtyggere (De Mil et al., 2015; Osselaere et al., 2016).

Spørsmålet om godkjenning av mykotoksinbindere blir jevnlig drøfta i EU's faste komitè for næringsmiddelkjeden og folkehelsen (EFSA Journal 2011; 9 (12):2481).

## Prosjektorganisering

Norsk senter for økologisk landbruk er prosjektansvarlig for begge prosjektene. Hovedsamarbeidspartnere er Universitetet i Oslo, Farmasøytisk institutt og Institutt for biovitenskap og NIVA.

Sjukdommen alveld er forårsaka av toksiner som ikke er endelig kjemisk identifisert og karakterisert.

Prosjektene hovedmål er å undersøke muligheten for å utvikle en bolus eller kapsel som inneholder stoffer som kan binde toksinene i dyret før de gjør skade.

Delmål i prosjektene er:

1. Undersøke omfanget og utbredelsen av sjukdommen alveld.
2. Nødvendig analysearbeid for identifisering av toksinene.
3. Teste ulike stoffer som kan binde toksinene og bygge dette inn i en kapsel som kan gis til sau/lam.
4. Dersom resultatene er lovende, er det et mål å utvikle en større søknad for utprøving av forebyggende tiltak i felt.

Prosjektene er delt i ulike arbeidspakker, der institusjonene har hatt ansvar for hver sine arbeidsoppgaver, men sammen har drøfta prosjektplan, prosjektgjennomføring og resultater:

1. Spørreundersøkelse for å få større sikkerhet om utbredelse og omfang av sjukdommen alveld og tapsårsaker generelt for lam på utmarksbeite. (NORSØK)
2. Utvikling av en testbolus til bruk for lam – finne fram til riktig vekt, størrelse og form for en bolus som kan benyttes til lam i den kritiske delen av beiteperioden. (UiO /NORSØK)
3. Identifisere og karakterisere toksinene som forårsaker sjukdommen. (UiO/NIVA)
4. Utvikle en kjemisk fellingsreaksjon som binder toksinet. (UiO)
5. Rapportering, formidling og videre utvikling av arbeidet. (NORSØK/UiO)

Rapporten vil beskrive metoder og resultater for hver arbeidspakke i de to prosjektene, deretter foreta en oppsummerende diskusjon og drøfting av vegen videre og rapportere publisering og formidling fra prosjektet.



# Spørreundersøkelse

## Metode

I juni 2015 sendte vi ut et spørreskjema til alle aktive lammeprodusenter med en aktiv e-postadresse i Hedmark, Møre og Romsdal, Oppland, Sogn og Fjordane, Nord-Trøndelag og Sør-Trøndelag. Totalt sendte vi ut spørsmåla til 1538 produsenter. En påminnelse ble sendt ut i mars 2016 til de produsentene som enda ikke hadde svart.

Undersøkelsen bestod av spørsmål om produksjonsåret 2014. Den var oppdelt i generelle spørsmål (antall dyr født, rase etc), vårbeiteperiode (antall døde dyr, dødsårsaker), sommerbeiteperioden (antall døde dyr, dødsårsaker etc) og høstsesongen (antall døde dyr, dødsårsaker etc). I denne rapporten går vi først og fremst inn på svara om dødsårsak for alle tre beiteperiodene, vår, sommer og høst. Spørreskjemaet er vedlagt i sin helhet (vedlegg 1).

## Resultater

### Respondenter

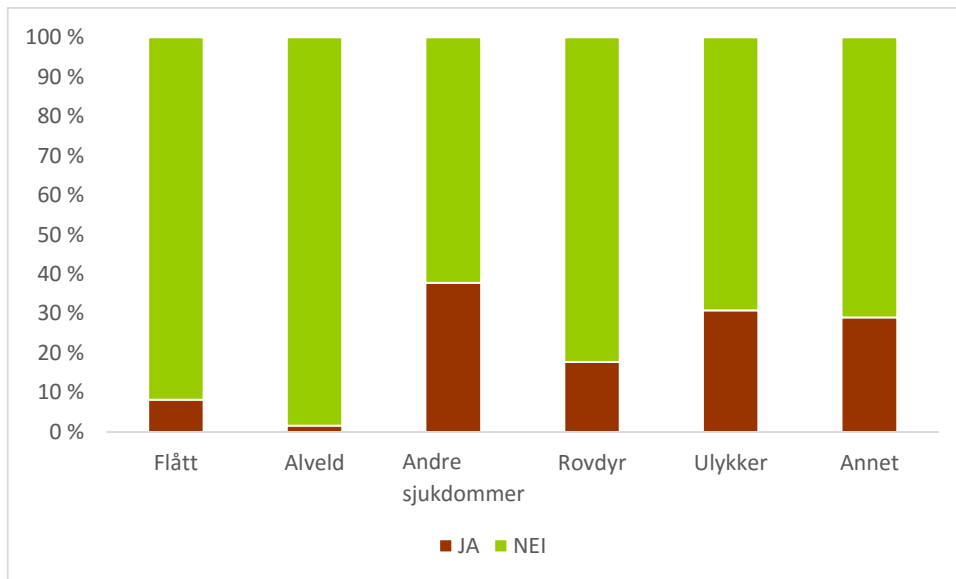
Av de 1538 skjemaene som ble sendt ut, var 31 e-postadresser ikke lenger aktuelle. Dermed hadde vi et antall på 1507 produsenter. Vi fikk tilbake 125 svar (svarprosent 8,3%). Oppdelt på fylker kom 13 av respondentene fra Hedmark, 26 fra Møre og Romsdal, 18 fra Nord-Trøndelag, 36 fra Oppland, 21 fra Sogn og Fjordane og 8 fra Sør-Trøndelag. Da alle spørsmål var frivillige, varierer svarprosenten noe mellom de ulike spørsmåla.

### Vårsesongen

På spørsmålene «Etter din oppfatning, hvor vanlig er det at lammene døde pga. flåttsjukdom, alveld, andre sjukdommer, rovdyr, ulykker eller annet på vårbeite 2014?» var den vanligste oppfatningen at «Andre sjukdommer» var den vanligste dødsårsaken. 22,7 % anslo at «Andre sjukdommer» var den vanligste dødsårsaken på vårbeite. Deretter kom ulykker (30,8%), annet (29,1%), rovdyr (17,8%), flåttsjukdom (8%) og alveld (1,7%). Se tabell 1 og figur 1 for detaljerte data.

**Tabell 1. Prosent og antall (i parentes) av respondentene som anslo flåttsjukdom, alveld, andre sjukdommer, rovdyr, ulykker eller annet var hoveddødsårsaken (>50%), vanlig dødsårsak (25-50%), forekommer som dødsårsak (1-24%) eller ingen dødsårsak (0%) for dyr på vårbeite.**

	>50%	25-50%	1-24%	0%	Totalt
Flått	0,8% (1)	1,6% (2)	5,7% (7)	91,8% (112)	125
Alveld	0%	0%	1,7% (2)	98,3% (119)	121
Andre sjukdommer	22,7% (27)	3,4% (4)	11,8% (14)	62,2% (74)	119
Rovdyr	3,4% (4)	2,5% (3)	11,9% (14)	82,2% (97)	118
Ulykker	5,8% (7)	2,5% (3)	22,5% (27)	69,2% (83)	120
Annet	9,4% (11)	0,9% (1)	18,8% (22)	70,9% (83)	117



**Figur 1.** Prosent av respondentene som anslo at flåttsjukdom, alveld, andre sjukdommer, rovdyr, ulykker eller annet var hoved-dødsårsaken som forekom som dødsårsak på vårbeite (>1%) eller ikke forekom i det hele tatt (0%).

Hvordan respondentene oppfattet dødsårsak på vårbeite skilte seg mellom respondentene fra de ulike fylkene. Her har vi valgt å dele opp svarene i om en viss dødsårsak forekom eller om det ikke forekom tap på vårbeite. (0%, Nei) på vårbeite (>1%, Ja). Vanligst i de fleste av fylkene var fortsatt «Andre sjukdommer», utenom i Sogn og Fjordane der ulykker var vanligst forekommende (47,6% av respondentene oppga at ulykker forekom som dødsårsak på vårbeite) og i Nord-Trøndelag var «Annet» like vanlig (27,8%). Forøvrig var forskjellene størst for flått, alveld og rovdyr. Når det gjelder flått er ikke dette nevnt som dødsårsak verken i Hedmark, Nord-Trøndelag eller Sør-Trøndelag, og svært sparsomt i Oppland (2,8%). I kystfylkene Møre og Romsdal og Sogn og Fjordane oppga henholdsvis 23,1% og 14 % at det forekom som dødsårsak på vårbeite i noen grad. Rovdyr forekom ikke i Hedmark eller Sør-Trøndelag, mens 15,8% -25% oppfattet det som en dødsårsak i de andre fylkene. Når det gjelder alveld så var det bare en respondent i Møre og Romsdal og en i Sogn og Fjordane som oppfattet at alveld forekom i noen grad som dødsårsak på vårbeite. Se detaljerte data i Tabell 2.

**Tabell 2.** Prosent av og antall (i parentes) respondenter som hadde opplevd flått flåttsjukdom, alveld, andre sjukdommer, rovdyr, ulykker, annet som dødsårsak i noen grad på vårbeite.

	Hedmark		Møre og Romsdal		Nord-Trøndelag		Oppland		Sogn og Fjordane		Sør-Trøndelag	
	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei
Flått	0 (0)	100 (13)	23,1 (6)	76,9 (20)	0 (0)	100 (18)	2,8 (1)	97,2 (35)	14,3 (3)	85,7 (18)	0 (0)	100 (8)
Alveld	0 (0)	100 (13)	4 (1)	96 (24)	0 (0)	100 (18)	0 (0)	100 (36)	4,8 (1)	95,2 (21)	0 (0)	100 (8)
Andre sjukdommer	41,7 (5)	58,3 (7)	44 (11)	56,0 (14)	27,8 (5)	72,2 (13)	45,7 (16)	54,3 (19)	33,3 (7)	66,7 (14)	12,5 (1)	87,5 (7)
Rovdyr	0 (0)	100 (13)	20,8 (5)	79,2 (19)	22,2 (4)	77,8 (14)	25 (9)	75 (27)	15,8 (3)	84,2 (16)	0 (0)	100 (8)
Ulykker	15,4 (2)	84,6 (11)	40 (10)	60 (15)	16,7 (3)	83,3 (15)	31,4 (11)	68,6 (24)	47,6 (10)	52,4 (11)	12,5 (1)	87,5 (7)
Annet	38,5 (5)	61,5 (8)	33,3 (8)	66,7 (16)	27,8 (5)	72,2 (13)	30,3 (10)	69,7 (23)	28,6 (6)	71,4 (15)	0 (0)	100 (8)

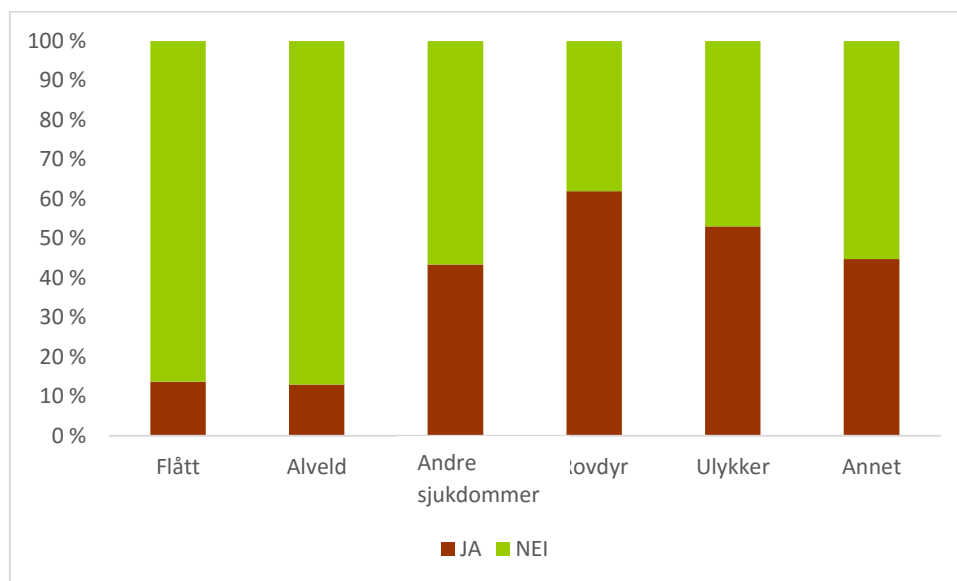
På spørsmål om hvilke sykdommer som inngikk i «Andre sykdommer» så ble nevnt lungebetennelser, leddbetennelser, fluemakk, kolikk, lammelse, dårlig immunforsvar pga næringsbrist/brist på melk, koksidiose, mineral-/vitaminmangel (jern, selen, vitaminer), diarè, graskrampe, dehydrering, betennelser, pulpanyre, pasteurellose og «magerelaterte» sykdommer.

Sommersesongen

Gjennom beitesesongen i utmark endres de vanligste mistenkte dødsårsakene seg noe og rovdyr ble rapportert som vanligste dødsårsak (61,9% anslo at de hadde tapt minst et dyr til rovdyr), som følge av ulykker (53%) og «annet» (44,7%). 31% av respondentene svarte at over 50 % av tapet skyldtes rovdyr. Til sammenligning økte både andelen flåttsykdommer (13,7%) og alveld (12,9%) i forhold til vårsesongen. To respondenter anslo at mer enn 50 % av lammedødeligheten skyldtes flåttsykdommer og en anslo alveld til å være hoveddødsårsaken på utmarksbeite. Detaljer finnes i tabell 3 og figur 2.

**Tabell 3. Prosent og antall av respondentene (i parentes) som oppga at flåttsykdom, alveld, andre sykdommer, rovdyr, ulykker eller annet var hoved-dødsårsaken (>50%), vanlig dødsårsak (25-50%), forekommer som dødsårsak (1-24%) eller ingen dødsårsak (0%) for dyr på utmarksbeite.**

	>50%	25-50%	1-24%	0%	Totalt
Flått	1,7% (2)	0%	12% (14)	86,3% (101)	117
Alveld	0,9% (1)	0%	12,1% (14)	87,1% (101)	116
Andre sykdommer	3,5% (4)	4,4% (5)	35,4% (40)	56,6% (64)	113
Rovdyr	31% (35)	10,6% (12)	20,4% (23)	38,1% (43)	113
Ulykker	5,2% (6)	7% (8)	40,9% (47)	47% (54)	115
Annet	5,3% (6)	2,6% (3)	36,8% (42)	55,3% (63)	114



**Figur 2. Antall prosent av respondentene som anså at flåttsykdom, alveld, andre sykdommer, rovdyr, ulykker, annet var hoved-dødsårsaken som forekom som dødsårsak på sommerbeite (>1%) eller ikke forekom overhodet (0%).**

På utmarksbeite virker det som at dødsårsakene er ulike mellom fylker og dette gjelder i hovedsak dødsårsaker knyttet til flåttrelaterte sykdommer og alveld. Flåttsykdommer rapporteres ikke som dødsårsak i Hedmark eller Sør-Trøndelag og svært sjelden i Nord Trøndelag og Oppland (en respondent i hvert fylke). Derimot anga 35 av respondentene (29,2%) at flåttsykdommer forekom som dødsårsak i Sogn og Fjordane og Møre og Romsdal.

Alveld ble ikke ansett som dødsårsak i Hedmark og Oppland, mens 6 (33,3%) respondenter i Nord Trøndelag og 5 (21,7%) i Møre og Romsdal oppga at de tapte en del dyr som følge av alveld.

**Tabell 4. Prosent av og antall (i parentes) respondenter som hadde opplevd flåttsjukdom, alveld, andre sjukdommer, rovdyr, ulykker eller annet som dødsårsak i noen grad på utmarksbeite.**

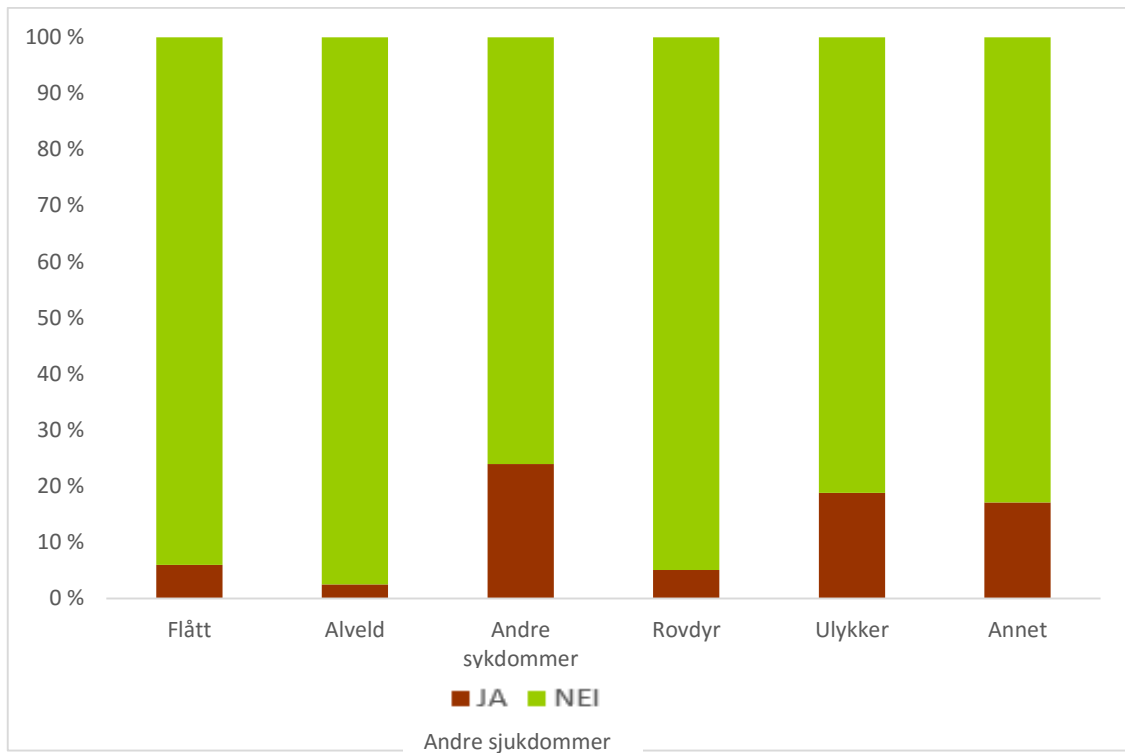
	Hedmark		Møre og Romsdal		Nord - Trøndelag		Oppland		Sogn og Fjordane		Sør-Trøndelag	
	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei
Flått	0 (0)	100 (13)	29,2 (7)	70,8 (17)	5,6 (1)	94,4 (17)	2,9 (1)	97,1 (34)	35 (7)	65 (13)	0 (0)	100 (7)
Alveld	0 (0)	100 (13)	21,7 (5)	78,3 (18)	33,3 (6)	66,7 (12)	0 (0)	100 (34)	9,5 (2)	90,5 (19)	28,6 (2)	71,4 (5)
Andre sjukdommer	27,3 (3)	72,7 (8)	45,8 (11)	54,2 (13)	52,9 (9)	47,1 (8)	31,4 (11)	68,6 (24)	57,9 (11)	42,1 (8)	57,1 (4)	42,9 (3)
Rovdyr	58,3 (7)	41,7 (5)	59,1 (13)	40,9 (9)	77,8 (14)	22,2 (4)	60,6 (20)	39,4 (13)	47,6 (10)	52,4 (11)	85,7 (6)	14,3 (1)
Ulykker	25 (3)	75 (9)	54,2 (13)	45,8 (11)	61,1 (11)	38,9 (7)	52,9 (18)	47,1 (16)	65 (13)	35 (7)	42,9 (3)	57,1 (4)
Annet	30,8 (4)	69,2 (9)	62,5 (15)	37,5 (9)	50 (9)	50 (9)	35,3 (12)	64,7 (22)	44,4 (8)	55,6 (10)	42,9 (4)	57,1 (7)

#### Høstsesongen

Gjennom høstsesongen var «Andre sjukdommer» den vanligste opplevde dødsårsaken (23,9% oppgav at de i noen grad tapte dyr pga dette). Flått og alveld var sjelden. Se detaljer i tabell 5 og figur 3.

**Tabell 5. Prosent og antall av respondentene (i parentes) som oppga at flåttsjukdom, alveld, andre sjukdommer, rovdyr, ulykker eller annet var hoved dødsårsaken (>50%), vanlig dødsårsak (25-50%), forekommer som dødsårsak (1-24%) eller ingen dødsårsak (0%) for dyr på høstbeite.**

	>50%	25-50%	1-24%	0%	
Flått	0,9% (1)	0%	5,1% (6)	94% (110)	117
Alveld	0%	0%	2,5% (3)	97,5% (117)	120
Andre sjukdommer	7,7% (9)	3,4% (4)	12,8% (15)	76,1% (89)	117
Rovdyr	0%	0,8% (1)	4,2% (5)	94,9% (112)	118
Ulykker	2,6% (3)	0,9% (1)	15,4% (18)	81,2% (95)	117
Annet	2,6% (3)	1 (0,9%)	13,7% (16)	82,9% (97)	117



Figur 3. Antall prosent av respondentene som anslo at flåttsjukdom, alveld, andre sykdommer, rovdyr, ulykker eller annet var hoved-dødsårsaken forekom som dødsårsak på høstbeite (>1%) eller ikke forekom overhodet (0%).

Mellom fylkene var det variasjon også på høstbeitet. Flått forekom utelukkende i Møre og Romsdal og Sogn og Fjordane, mens alveld forekom i Nord-Trøndelag. «Andre sykdommer» var vanligst i alle fylkene med unntak av Hedmark, der ulykker ble oftest rapportert.

Tabell 6. Prosent av og antall (i parentes) respondenter som hadde opplevd flåttsjukdom, alveld, andre sykdommer, rovdyr, ulykker, annet som dødsårsak i noen grad på høstbeite.

	Hedmark		Møre og Romsdal		Nord-Trøndelag		Oppland		Sogn og Fjordane		Sør-Trøndelag	
	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei	Ja	Nei
Flått	0 (0)	100 (11)	20,8 (5)	79,2 (19)	0 (0)	100 (19)	0 (0)	100 (34)	9,5 (2)	90,5 (19)	0 (0)	10 (8)
Alveld	0 (0)	100 (13)	4,2 (1)	95,8 (23)	5,3 (1)	94,7 (18)	2,9 (0)	97,1 (34)	0 (0)	100 (21)	0 (0)	10 (8)
Andre sykdommer	7,7 (1)	92,3 (12)	31,8 (7)	68,2 (15)	26, (5)	73,7 (14)	20, (7)	79,4 (27)	28, (6)	71,4 (15)	25 (2)	75 (6)
Rovdyr	0 (0)	100 (13)	4,2 (1)	95,8 (23)	10, (2)	89,5 (17)	5,9 (2)	94,1 (32)	0 (0)	100 (20)	12, (1)	87, (7)
Ulykker	15,4 (2)	84,6 (11)	23,8 (5)	76,2 (16)	21, (4)	78,9 (15)	20 (7)	80 (28)	14, (3)	85,7 (18)	12, (1)	87, (7)
Annet	8,3 (1)	91,7 (11)	20,8 (5)	79,2 (19)	27, (5)	72,2 (13)	14, (5)	85,3 (29)	14, (3)	85,7 (18)	12, (1)	87, (7)

Annet

På spørsmålet «Har du hatt tilfelle av alveld tidligere år? Kan du anslå omfang av tap?» svarte 38 produsenter (31,7%) ja. Man oppga at det var alt fra enkelttilfeller til relativt store tap hvert år. Noen svarte at det virker som enkelte raser er mindre mottakelige for alveld.

## Diskusjon

Det er svært vanskelig å anslå omfanget av alveld da vi i hovedsak fokuserte på ett år. Forekomsten av alveld virker å variere mye fra år til år, noe enkelte respondenter oppga som svar på spørsmålet om forekomst av alveld tidligere år. Men 31,7% av produsentene hadde en eller flere ganger mistet dyr pga alveld, noe en vurderer som en relativt høg prosentandel. Den kjente forekomsten av alveld i 2014 var som forventet høyest på sommerbeite, der 13 % av produsentene hadde mistet ett eller flere lam på grunn av alveld. Det var bare en respondent som oppga at alveld hadde vært den viktigste dødsårsaken, mens andre oppga at det hadde forekommet i beitesesongen. Det ser ut til å være store geografiske forskjeller. Alveld var vanligst i Nord-Trøndelag, Møre og Romsdal og Sør-Trøndelag, der mellom 22% og 39% hadde mistet lam på grunn av alveld i 2014, mens det ikke forekom i det hele tatt i Hedmark og Oppland og i svært liten grad i Sogn og Fjordane. Det er viktig å belyse disse geografiske forskjellene fordi det nasjonale måltallet ikke sier noe om hvor stort problem sjukdommen er i enkelte regioner og lokalt.

For eksempel er det i Møre og Romsdal, i beitelag under organisert beitebruk, sluppet 29 951 lam på beite i 2014 og tapet er på 2415 dyr. Det er et gjennomsnittlig tap på 8 %, men tapsprosenten i ulike beitelag varierer mellom 2,0% og 33,8 %.

Dette prosjektet omhandler først og fremst sjukdommen alveld, men når vi gjennomførte en slik spørreundersøkelse valgte vi også å se på andre dødsårsaker, da tap på beite generelt er et stort problem i Norge og tapsårsak er ofte ukjent eller udokumentert. For å få gjort noe med dette problemet, er det nødvendig å se på helheten rundt tapsårsaker på beite.

Det er velkjent at det er stor usikkerhet og lite kunnskap om tapsårsaker på beite. På utmarksbeite finner en igjen en svært liten del av de døde dyra, og til og med på innmarksbeite kan spesifikke sykdommer iblant være vanskelig å identifisere. I våre resultater var den vanligst oppgitte tapsårsaken på vårbeite «andre sykdommer», mens 8 % av respondentene hadde opplevd flåttssjukdom som tapsårsak. I gruppen «Andre sykdommer» inngår i følge produsentene lungebetennelse, leddbetennelse og dårlig immunforsvar. Alle disse symptomene er vanlige følgesykdommer etter en flåttbåren infeksjon med *Anaplasma phagocytophilum*. Når et lam blir infisert med *A.phag.*, er det sjelden det dør av den infeksjonen, men heller av sekundærinfeksjoner på grunn av det svekkede immunforsvaret som anaplasma påfører dyret. Selve anaplasma-infeksjonen er svært vanskelig å oppdage, men en har tidligere vist at en kan redusere dødeligheten i hardt angrepne besetninger med tidlig slipp av lam på beite (Grøva, 2011), gjennom ukentlige temperaturmålinger og tidlig behandling av sjukdommen (Sørheim, 2010). Det er derfor sannsynlig at flåttssykdommer er underrapportert i denne form for undersøkelser.

Også når det gjelder rovdyr skiller problematikken seg mellom fylker. I vårsesongen forekom ikke rovdyr som dødsårsak i det hele tatt i Hedmark og i Sør-Trøndelag, mens opp til en fjerdedel av respondentene i de øvrige fylkene oppga at det forekom i noen grad. På sommerbeite endret dette seg slik at rovdyr, som forventet, ble en vanligere dødsårsak i alle fylkene og i majoriteten av fylkene den vanligste dødsårsaken. Mer enn halvparten av respondentene i alle fylkene utenom Sogn og Fjordane oppfattet at de hadde tap på grunn av rovdyr. Aller vanligst syntes dette å være i Sør-Trøndelag, der bare en produsent ikke hadde mista noe dyr på grunn av rovdyr. På høstbeite virket rovdyrangrep å være uvanlig.

Hovedkonklusjonen fra denne spørreundersøkelsen er at dødsårsaken hos lam på beite varierer mellom fylkene og at dette er særlig tydelig når det gjelder alveld. Et annet hovedfunn er at en stor del av tapet av lam på utmarksbeite klassifiseres som «andre sykdommer» eller «annet», det vil si at vi ikke har sikker kunnskap om tapsårsak.

Dette innebærer at det må tas et helhetsgrep for å redusere tap av lam på beite, og at tiltaka kan komme til å være svært individuelle alt etter hvor og hvordan beiteområdet til produsenten er. Tiltaka må være både

forebyggende genetik, forebyggende behandling og tidlig oppdagelse av sjukdom og rovdyrangrep også på utmarksbeiter, samt behandlende (riktig, tidlig og direkte behandling av syke dyr, rask samling ved rovdyrangrep eller sjukdomsutbrudd). Slike tiltak krever ny kunnskap og nye metoder for å kunne kontrollere og behandle dyra på utmarksbeite, og vi ser store muligheter med ulike bolus for toksinbinding og minnerforsyning, med sensorer for automatisk registrering av ulike fysiologiske parametre samt et målretta avlsarbeid for høyere overlevingsgrad på ulike beiter.

## Bolusutforming

Bolus er en oral administreringsform brukt i veterinærmedisin for å frigi virkestoff over en forlenget tidsperiode til dyrets fordøyelsessystem. I alveldprosjektet ønsker vi å utforme bolus til lam for å felle toksiner som forårsaker sjukdommen alveld etter at lammene sendes ut på beite, vanligvis når lammene er rundt 2 måneder gamle. Det finnes i dag ingen legemidler for å forhindre alveld. Identifisering og karakterisering av toksin(ene) som forårsaker alveld er fortsatt ikke helt fullført. Når toksinene blir kjent, kan det spesifikt inkluderes virkestoff(er) som feller disse toksinene. Men det kan også etableres fellingsreaksjoner med mindre spesifikke virkestoffer. Virkestoff vil bli testet ut i en annen del av prosjektet. I denne arbeidspakken har vi konsentrert oss om utforming og testing av bolus til lam i aktuell aldersgruppe.

### Metode

I denne første runde av bolusutformingen var det nødvendig å bestemme ønsket form, dimensjoner og vekt på bolus til lam på rundt 2 måneder. Ønsket målsted for bolus er lammets nettmage, og denne er lite utviklet hos så unge dyr. Seks testbolus ble utformet som ønsket og applisert til 6 lam (ca. 2 mnd gamle) i juni 2015.

Vi ble i forkant av tillagingen enige om følgende for testbolus:

1. Den skal ikke inneholde virkestoff.
2. Den skal ikke brytes ned i testperioden som er opptil 4 uker (ikke-eroderbar bolus).
3. Den skal inneholde bariumsulfat for å kunne røntgendiagnostisere plassering av bolusen i lammene.
4. Den skal ha form som en sylinder og være uten skarpe kanter.
5. Diameteren skal passe inn i applikatoren, og være konstant for de 3 typene bolus.
6. Det er vekt og størrelse på bolusen som skal varieres i dette forsøket.
7. Høyden skal være henholdsvis: 3, 3,5 og 4 cm. Dette gir 3 typer bolus.
8. Vekten til bolus avhenger av høyden på sylindren.

Hvert av punktene er diskutert separat under:

1. Den skal ikke inneholde virkestoff.
2. Siden testbolus ikke skal brytes ned, trenger den ikke å inneholde virkestoff.  
Den skal ikke brytes ned i testperioden som er opptil 4 uker.

Vi ønsket i denne omgang kun å variere vekt (8-18 gram) og størrelse på bolus (3-4 cm). Videre ville vi at vekt og størrelse skal holde seg konstant for hver enkelt bolus under testperioden. Ikke-eroderbar bolus ble laget av hardplastmateriale som ble limt med et cyanoakrylat superlim (Klebfix, Würth).

- 3 Den skal inneholde bariumsulfat for å kunne røntgendiagnostisere plassering av bolusen i lammene.

Testbolus inneholder finpulverisert bariumsulfat (Ph.Eur; VWR Chemicals) som skal fungere som et radiokontrastmiddel, slik at testbolus kan vises på røntgenbilder av lam etter administrering til nettmagen.

Testbolus inneholder i tillegg blyhagl som også vil gi kontrast på røntgenbildene. Fettfasen i testbolus inneholder bleket bivoks og 5 % bariumsulfat.

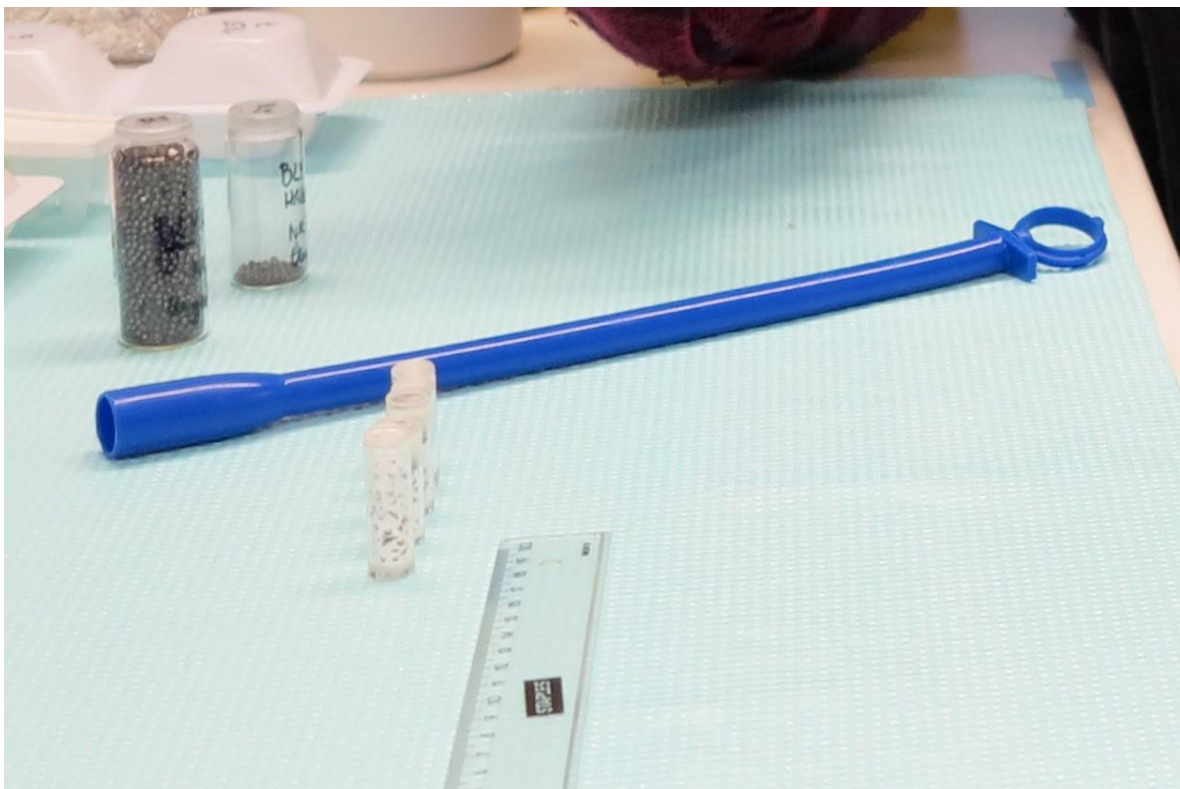
- 4 Den skal ha form som en sylinder og være uten skarpe kanter.

Basert på relevant litteratur og alveld-gruppens erfaringer ble sylinderformet bolus med avrundede kanter valgt som form på testbolus. Vi ønsket ikke at det skulle være noen skarpe kanter som kan gi skader i lammets fordøyelsessystem. Hardplastsylindere med plasttykkelse på 1 mm og indre diameter på 1 cm ble kuttet i passende lengder (3-4 cm) og pusset/avrundet for å unngå skarpe kanter. Arbeidet ble utført ved Sentralverkstedet ved Institutt for biovitenskap, Universitetet i Oslo. Egnete lokk til hver sylinder ble også tilpasset og limt med cyanoakrylat superlim (Klebfix, Würth).

- 5 Diameteren skal passe inn i applikatoren, og være konstant for bolustypene.

En standard applikator for lam ble tilpasset testbolus (ytre diameter: 1,2 cm; indre diameter: 1 cm). Tilpasningen gikk ut på å utvide plassen til bolus noe, da ytre diameter 1,2 cm på bolus var litt for stor til en standard applikator. Denne applikatoren vil medfølge de 6 testbolus for administrering til de aktuelle lammene.

**Bilde 1. Standard applikator for lam (Foto: Geir Holm, Fotoavdelingen, Det matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet, UiO).**



- 6 Det er vekt og størrelse på bolusen som skal varieres i dette forsøket.

Vekt og størrelse på testbolus varieres som vist i tabell 9.

- 7 Høyden skal være henholdsvis: 3, 3,5 og 4 cm. Dette gir 3 typer bolus.

Nettmagen til 2 måneder gamle lam er ca. 5 cm i diameter. Denne bør ikke fylles helt opp med bolus, da normal funksjon av nettmagen må opprettholdes. Vi valgte derfor en lengde på 3-4 cm for testbolus.



8 Vekten til bolus avhenger av høyden på sylindren.

Basert på aktuell litteratur ønsket vi en bolus i vektintervallet 5-20 gram for bolus. Pellets på 5 gram har tidligere vist seg å være for lette til å forbli i nettmagen (Dewey et al., 1958)

Bolus skal testes på 6 lam. Plassering av bolus etter innlegging dokumenteres med røntgenfotografering.

Fordøyelsetraktus skal undersøkes ved slakting eller død av lamma med tanke på eventuelle skader etter bolus.

Tilvekst hos lamma som fikk innlagt bolus skal sammenlignes med kontrollgruppe for å se om bolusen kan ha hatt effekt på fôroptak og tilvekst. Eventuell statistisk forskjell i tilvekst beregnes etter uavhengig t-test i SATS (2011).

## Resultater

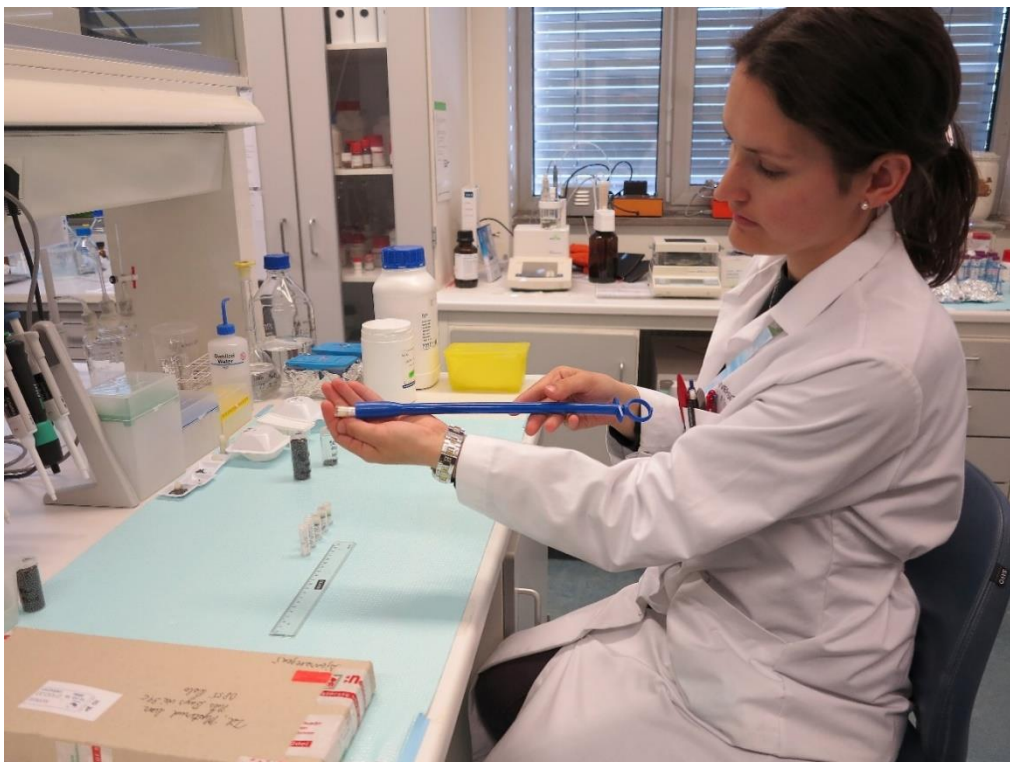
Utforming av bolus

Tabell 7. Størrelse og vekt på boluser som ble laget.

Boluslengde (cm)	Vekt (g)
3	8
3,5	13
4	18

Den maksimale vekten vi klarte å oppnå for våre relativt små bolus var 18 gram.

Bilde 2. Fra laboratoriet på Farmasøytisk institutt, UiO. Marianne Lilletvedt Tovsen arbeider med produksjon av bolus (Foto: Geir Holm).



Hardplastrør med tilhørende bunn- og topplokk og korrekte dimensjoner ble tillaget og pusset ved Sentralverkstedet ved Institutt for biovitenskap, Universitetet i Oslo. De seks aktuelle rørene (to av hver lengde) med pålimte bunnlokk fra verkstedet ble fylt til ønsket vekt: 8, 13 og 18 g ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Alle rørene ble helt eller delvis fylt lagvis med finpulverisert bariumsulfat og blyhagl, hvor bariumsulfat legger seg mellom hulrommene til blyhagl. Både bariumsulfat og blyhagl vil gi kontrast på røntgenbildene, og de gir forhåpentligvis den nødvendige tyngden på bolus for at den skal kunne holde seg på plass i nettmagen. Enkelte av bolus ble videre tilsatt smeltet bivoks (se detaljer under for tillaging av smelte) for å fylle opp det gjenværende volumet. Toppløkket kunne klikkes enkelt på, og dette ble limt fast med et enkomponent lim (Klebfix). Små ujevnheter rundt toppløkket etter limingen ble lett pusset med sandpapir.

**Tabell 8. Innholdsstoffer i bolus.**

Informasjon om innholdsstoffene	Navn, leverandør
Hardplastrør med tilhørende lokk Blyhagl	Spesiallaget ved Sentralverkstedet ved Institutt for biovitenskap, Universitetet i Oslo. Nike, Budapest, Ungarn, kal.12/70 mm, hagl N° 7.
Bariumsulfat	Barium sulphate, fine powder Ph.Eur, VWR Chemicals, BaSO <sub>4</sub> , Mm: 233,40 g/mol, Product: 21763.292, Batch: 14E080003, 1 kg.
Bleket bivoks	Cera alba, voks hvit, Apotekproduksjon AS, 0.5 kg, 304758, Batch: 12J084/1.
Lim	Klebfix, cyanoakrylat superlim (Würth) for liming av metall, plast, gummi, Art.nr. 08930900 B/N.
Sandpapir	Aluminium-Oxid waterproof P1200 (Würth), Art.-Nr. 584011200.

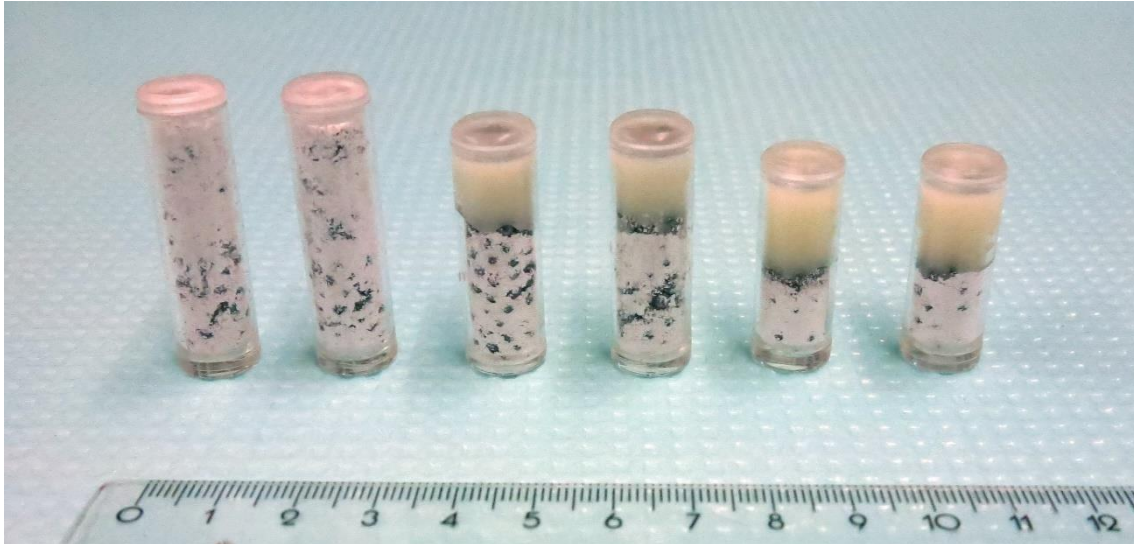
Tillaging av smelte som skal plasseres øverst i bolus med høyde 3 og 3,5 cm.

**Tabell 9. Sammensetning til 5 % bariumsulfat-smelte.**

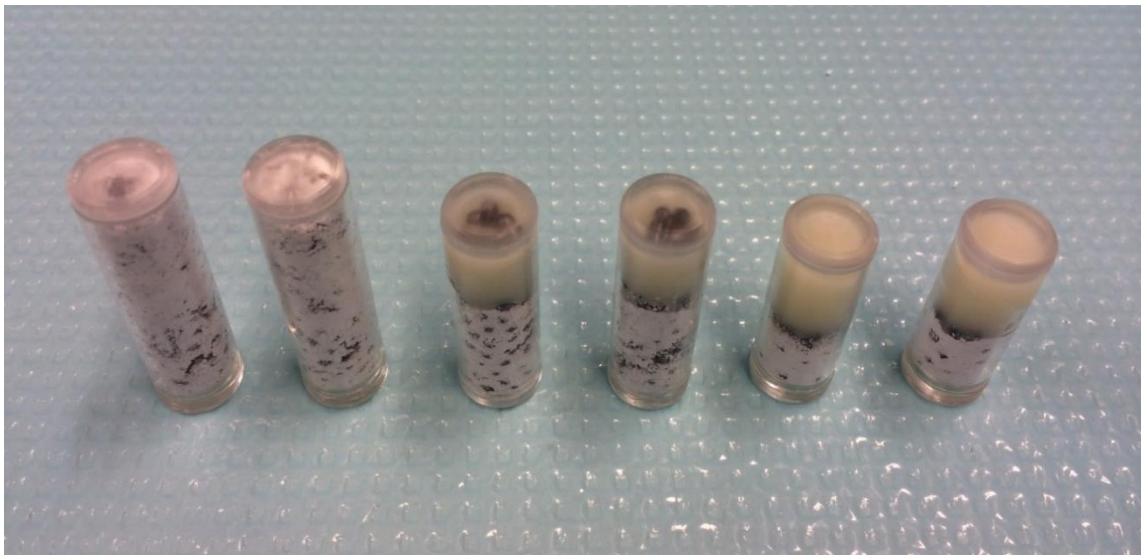
Stoffer	Ønsket mengde
Cera alba	14,25 gram (14,10-14,39 gram)
II Bariumsulfat	0,75 gram (0,7425-0,7575 gram)

Cera alba og bariumsulfat ble blanda og oppvarma i vannbad. Blandingen ble tømt direkte i hardplastrøra.

**Bilde 3. Seks testbolus, tre typer med lengde hhv 3, 3,5 og 4 cm, to av hver type (Foto: Geir Holm).**



**Bilde 4. Merk at bolus med høyde 3,5 cm (de to i midten) har 4 blyhagl på toppen over voksen for å oppnå ønsket vekt på bolus (Foto: Geir Holm).**



Figur 4. Beskrivelse av de ulike bolusene. Merk at bolus med høyde 3 og 3,5 cm har 4 blyhagl på toppen over voksen for å oppnå ønsket vekt på bolusen.

	<p>Høyde: 3 cm                      Indre diameter: 1 cm                      Ytre diameter: 1,2 cm                      Vekt: 8,32 eller 8,35 gram                      Bestanddeler:                      Hardplastrør (tykkelse: 1 mm) med bunn- og topplokk                      Blyhagl                      Bariumsulfat, finpulverisert (<math>\text{BaSO}_4</math>)                      Bleket bivoks inneholdende 5 % <math>\text{BaSO}_4</math>                      Høyde <math>\text{BaSO}_4</math> og blyhagl: 1,2 eller 1,3 cm                      Høyde voks inneholdende 5 % <math>\text{BaSO}_4</math>: 1,2 eller 1,3 cm                      Volum for innholdsstoffer: 2 ml</p>
	<p>Høyde: 3,5 cm                      Indre diameter: 1 cm                      Ytre diameter: 1,2 cm                      Vekt: 13,01 eller 13,04 gram                      Bestanddeler:                      Hardplastrør (tykkelse: 1 mm) med bunn- og topplokk                      Blyhagl                      Bariumsulfat, finpulverisert (<math>\text{BaSO}_4</math>)                      Bleket bivoks inneholdende 5 % <math>\text{BaSO}_4</math>                      Høyde <math>\text{BaSO}_4</math> og blyhagl: 2 cm                      Høyde voks inneholdende 5 % <math>\text{BaSO}_4</math>: 1 cm                      Volum for innholdsstoffer: 2,4 ml</p>
	<p>Høyde: 4 cm                      Indre diameter: 1 cm                      Ytre diameter: 1,2 cm                      Vekt: 18,01 eller 18,02 gram                      Bestanddeler:                      Hardplastrør (tykkelse: 1 mm) med bunn- og topplokk                      Blyhagl                      Bariumsulfat, finpulverisert (<math>\text{BaSO}_4</math>)                      Høyde <math>\text{BaSO}_4</math> og blyhagl: 3,6 cm                      Volum for innholdsstoffer: 2,8 ml</p>

Testing av bolus på lam

### Administrasjon av bolus

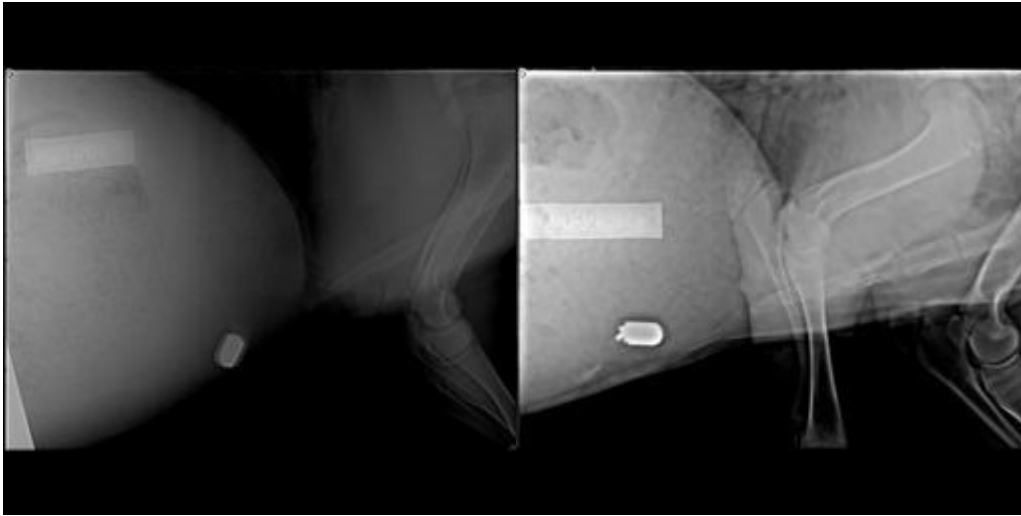
I juni 2015 ble seks lam med vekt 16-22,5 kg (ca. 2 mnd. gamle) gitt 1 bolus hver ved hjelp av en standard applikator.

Bolusen ble smurt med solsikkeolje før administrering, og den gled lett ned gjennom spiserøret og var enkel å applisere. Etter noen minutter ble lammene tatt bilde av ved hjelp av mobilt røntgenutstyr. Alle bildene ble merket med nummer på dyret. På 5 av 6 bilder viste det seg at bolus lå på eksakt samme plass nederst i nettmagen. På det største lammet lå bolus litt høyere oppe i nettmagen. Dette kan skyldes at lammet var det største med mest velutviklet nettmage og kanskje mer innhold som krever lengre tid for at bolus skal synke ned. Lammene ble deretter fraktet til heimebeitet for å gå der med sine mødre. 18 dager etter administrering (tidspunkt valgt av praktiske årsaker) ble lamma røntgenfotografert igjen. Alle 6 bolus lå fortsatt i nettmagen.

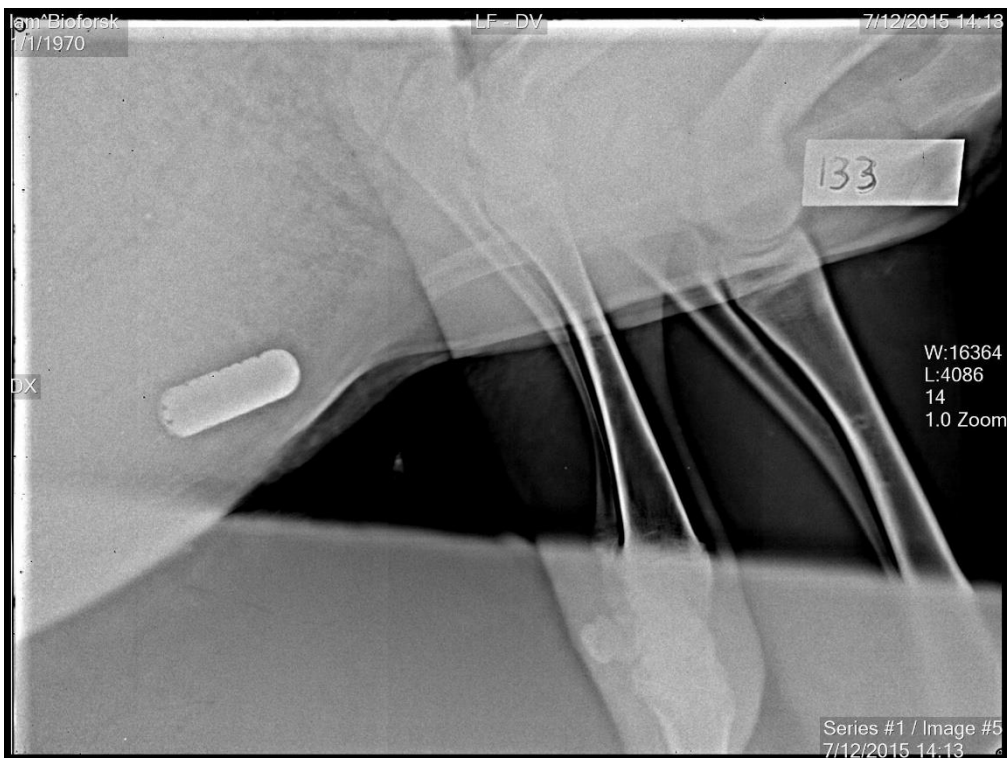
Bilde 5. Innlegging av bolus på lam (Foto: Peggy Haugnes).



Bilde 6. Røntgenfotografering av bolusplassering rett etter innlegging (Foto: Nils Arild Sæther).



Bilde 7. Røntgenfotografering av bolusplassering 18 dager etter innlegging (Foto: Nils Arild Sæther).



#### Obduksjon ved slakting

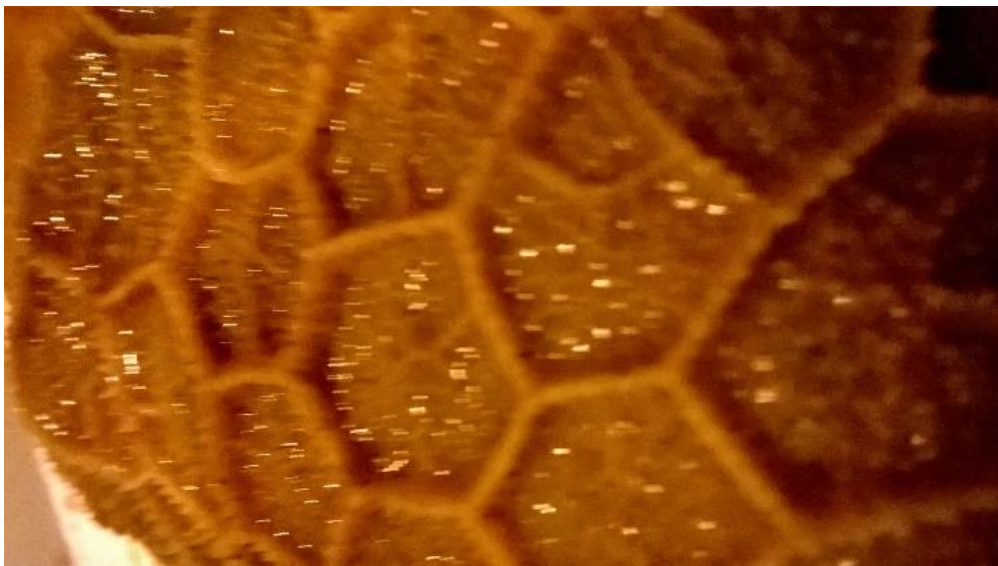
Ett lam døde den 5. august. Sannsynlig dødsårsak er sjodogg, som er utbredt i denne besetninga. Lammet ble obdusert (formager, løpe og hele tarmsystemet ble åpnet og rengjort) for å finne ut om bolus fortsatt var i fordøyelsestraktus og om den hadde forårsaket skade i nettmagen eller andre deler av fordøyelsessystemet. Bolus på 4 cm var lagt inn i dette lammet. Bolusen var ikke lenger til stede i dyrets fordøyelsessystem. Det var ikke spor etter skader på grunn av bolusen.

Den 10. desember ble resten av forsøkslamma slakta. Hele fordøyelsestraktus ble tatt ut og gjennomført for å finne bolus og se om det var skader etter bolus. Bolus var forsvunnet fra alle lamma. Det var ikke spor etter skader på grunn av bolusen på noen av dyra.

Bilde 8. Nettmage fra lam nr 50027, slakta 10.desember (Foto: Kristin Sørheim).



Bilde 9. Nettmage fra lam nr 50144, slakta 10.desember (Foto: Kristin Sørheim).



#### Tilvekst

Fødselsvekt, vårvekt/sommervekt og høstvekt ble registrert for de seks lamma som fikk innlagt bolus og for ei kontrollgruppe på seks lam fra samme besetning og som gikk på samme beite om sommeren.

Tabell 10. Tilvekst i gram per dag for boluslam og kontroll-gruppe.

Individ	F.dato	Kjønn	F.vekt (kg)	Kg 24.06	Kg 12.07	Kg 01.09	Dager	Tilvekst g/dag
Kontroll1	9.04	v	2,7		17		114	
Kontroll2	9.04	v	3,5		31	37	114	293
Kontroll3	12.04	v	5,1		31	40,5	111	381
Kontroll4	19.04	v	5,4		26	31	104	246
Kontroll5	23.04	v	5		26	29	100	240

Kontroll6	25.04	s	3,9	23	34	98	307
Bolus1	9.04	s	3	22	30	114	236
Bolus2	13.04	s	3,2	16	33	110	271
Bolus3	19.04	s	3,7	16	26	104	214
Bolus4	25.04	s	4,8	17	31	98	267
Bolus5	25.04	s	4,4	17	0	98	DØD
Bolus6	27.04	v	5,5	16	26	96	213

Sammenligning av tilvekst mellom forsøksdyra som fikk innlagt bolus og kontrollgruppe ble analysert for tre ulike tilvekstperioder med uavhengig T-test i SAS (SAS 2011). Høyere tilvekst hos værlam sammenlignet med søyelam ble korrigert med en faktor på 1,14 (Sauekontrollen, 2012).

**Tabell 11. T-test for tilvekst hos boluslam og kontrollam uten bolus. Gjennomsnittlig tilvekst i periodene født – vekt 1, vekt 1 – vekt 2 og født – vekt 2, differanse, t-verdi og p-verdi. Vekt er korrigert for kjønn med faktor 1,14.**

Tilvekstperiode:	Bolus	Kontroll	Differanse	t-verdi	p-verdi
	g	g	g		
født - vekt1	253	225	+28	1,06	0,313
vekt1 - vekt2	141	191	- 49	-1,13	0,291
født - vekt2	224	205	+ 17	0,78	0,459

Det er ikke påvist signifikant forskjell i tilvekst mellom boluslam og kontrollam i noen av tilvekstperiodene. Lammene som hadde bolus hadde en lavere tilvekst i perioden vekt1-vekt2, men høyere tilvekst i perioden født – vekt1. Bolus var i lammet hovedsakelig i perioden vekt1-vekt2. Lavt antall observasjoner gjør det vanskelig å avdekke signifikante forskjeller.

## Diskusjon

Et mål med prosjektet var å finne en hensiktsmessig utforming av bolus, dvs finne egnet form, størrelse og vekt på en bolus som kan administreres til 6-8 uker gamle lam og holdes på plass i nettmagen tilstrekkelig lenge til å avgj toksinfellende stoff i den perioden dyra er utsatt for å få i seg toksinene. Forsøket viste at sylindrerformen er egnet. Dimensjoner inntil lengde 4 cm x 1,2 cm diameter er funnet å være akseptable. En bolusvekt ned til 8 gram gir en retensjon av bolus på over 3 uker, noe som vurderes som tilstrekkelig for å fange opp den mest risikoutsatte tida for sjukdommen alveld.

Det må gjennomføres videre forskning for å komme fram til en riktig formel for innholdet i en toksinfellende bolus. Det er etter vår vurdering viktig å finne fram til en *ikke-spesifikk fellingsreaksjon*, dvs at vi ønsker at bolus skal felle grupper av toksiner og slik gi større beskyttelse mot ulike sykdommer forårsaket av toksiner. På bakgrunn av de oppnådde resultatene mener vi det kan utvikles en bolusformulering som i *in vitro* forsøk kan oppvise de ønskede egenskaper. En slik formulering utvikling vil ta anslagsvis to år. Utvikling av egnede formuleringer som skal virke i et biologisk miljø med forutsigbar effekt tar erfaringsmessig ganske lang tid. Dette gjelder både innen humanmedisin og veterinærmedisin. Etter *in vitro* testing, må en gjennomføre utprøving på dyr i felt før en kan vurdere effekten.



# Toksinkarakterisering

Det var oppdagelsen av biofilmen i Møre og Romsdal 2007 med et markert innslag av cyanobakterier som satte ny retning i alvelforskningen, og som var bakgrunnen for søknad om finansiering av videre utredningsarbeid. Det har vært et møysommelig arbeid som har pågått i flere år med å identifisere arter, utvikle teknikker for å dyrke dem i renkultur for så å undersøke om de produserer toksiner, - og i tilfelle hvilke. Arbeidet med å identifisere aktuelle levertoksiske giftstoffer har fokusert på de to mest mistenkte artene, nemlig cyanobakteriene *Stigonema* og *Symplocastrum* (Skulberg et al., 2012).

Kulturene *Symplocastrum* NIVA-CYA 644 og *Stigonema* NIVA-CYA 646 ble valgt ut som objekter til analysearbeidet rettet mot kjemisk karakterisering av toksinene og deres stofflige struktur. Det kulturtekniske arbeidet og produksjon av biomasse til forskningsformål er foretatt av Randi Skulberg ved NIVAs kultursamling i Oslo.

I tillegg til analysearbeidet er det framskaffet ny biologisk kunnskap om tilpasninger og særegenheter knyttet til de toksinene cyanobakteriene i biofilmen (Skulberg et al., 2012; Mysterud et al., innsendt).

## Metode

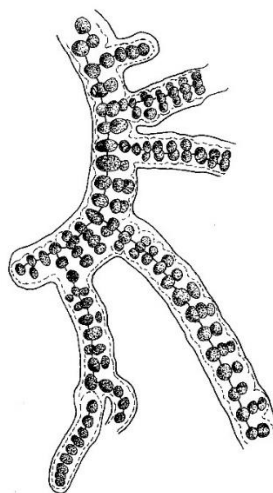
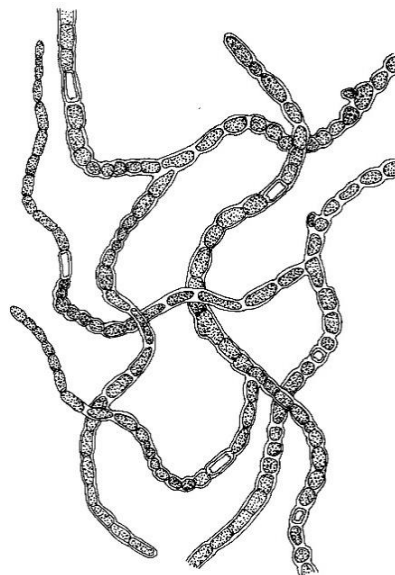
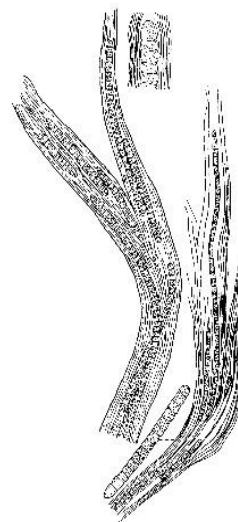
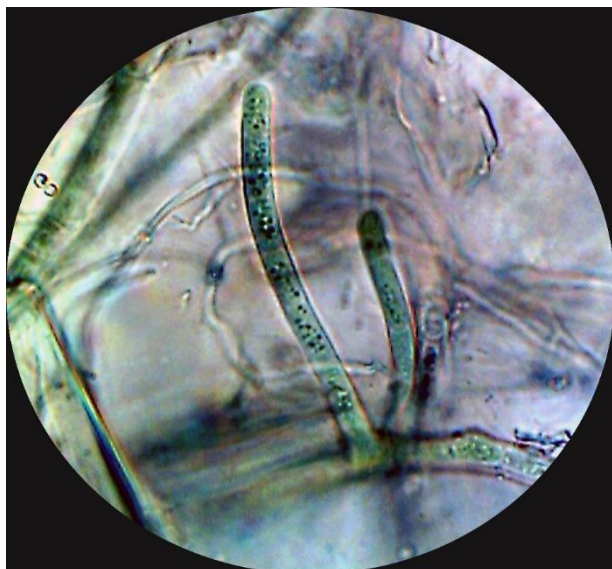
Kulturteknisk del

Utvalget med stammer av cyanobakterier som er med i analys materialet kommer fra Slettfjellet, Halså i Møre og Romsdal, der en over tid har fulgt forekomst av alveld med utvikling av biofilmen (Mysterud et al., innsendt). Dette arbeidet har vært utført i laboratorier på Norsk institutt for vannforskning (NIVA) hvor alle prosjektets kulturer oppbevares. De mest aktuelle cyanobakteriene som er analysert med hensyn på cyanotoksiner er artene *Stigonema* og *Symplocastrum* (Fig. 5). Disse artene er rendyrket i kultur hos NIVA under ledelse av Olav Skulberg. Når det gjelder *Symplocastrum*, ble det isolert 6 kloner fra vegetasjonsperioden 2013. Tilsvarende ble det av *Stigonema* isolert i alt 12 kloner i 2013. Av disse ble det bare 2 kloner som kom i god vekst og ble videreført. I 2015 foreligger det totalt 7 klonkulturer av *Symplocastrum* og 4 av *Stigonema*. Både for *Symplocastrum* og *Stigonema* gjelder det at de vokser langsomt. Før ny poding eller høsting av materiale til forsøk/analyser kan bli aktuelt, må det regnes med en vekstperiode på to måneder eller mer.

*Symplocastrum* og *Stigonema* dyrkes i 20% Z8 (standard vekstmedium for cyanobakterier) tilsatt jordekstrakt og vitaminer. *Symplocastrum* dyrkes i klimarom ved temperatur 16 °C, hvor lyset veksler mellom 12 timer dag og 12 timer natt. *Stigonema* holdes ved 20°C med kontinuerlig belysning. Kulturene må følges, og blir kontrollert med jevne mellomrom. Prøvematerialet til arbeidet med bestemmelser av cyanotoksinenes kjemiske natur ble produsert 2015 under definerte vekstbetingelser. Høsting og preparering med frysetørring av oppdyrket materiale ble foretatt i NIVAs laboratorier.

Identifisering og karakterisering av toksiner fra de aktuelle artene er utført i samarbeid med laboratorier i Bad Elster, Tyskland og Trebon, Tsjekia. Prøver av biofilmen ble først undersøkt med hensyn på biologisk aktivitet i Bad Elster og de viste meget tydelige levertoksiske egenskaper. For en sikker identifisering av eventuelle levertoksiner, som skal gjøres med HPLC-MS, trengs minst 200 mg frysetørret materiale (Krav fra laboratoriet i Trebon). Selv med 200 mg kan man ikke være sikker på identifisering av enkeltkomponenter i prøven, som jo er avhengig av mengde enkelttoksiner som er tilstede. Analysen av prøven fra Oslo ble i Trebon «matchet» mot et bibliotek av ca. 320 kjente giftstoffer produsert av cyanobakterier «worldwide». Institusjonen i Tsjekia har spesialisert seg på stoffgrupper som kan være aktuelle i alveldsammenheng, og den første analysen indikerte tilstedeværelse av en «ny» toksingruppe. For nærmere å karakterisere toksinene og å identifisere enkeltkomponenter trengs mer materiale, og Olav Skulberg, NIVA sendte determinerte arter av *Stigonema* og *Symplocastrum* til Trebon for videre oppdyrking. Det forventes at oppdyrkingen vil ta litt tid, men at en sikker identifikasjon av både toksingruppe og enkeltkomponenter kan gjennomføres når tilstrekkelig materiale er tilgjengelig. Fremdriften for denne sluttfasen er diskutert ved besøk av Jan Karlsen og Ivar Mysterud i Trebon. Det endelige resultatet av analysene vil bli publisert når ytterligere analyser er slutført. Det har ikke vært mulig innenfor tidsrammen for det utredningsarbeidet som omtales i denne rapporten å fullføre dette vanskelige kultiverings- og analysearbeidet.

Figur 5. Illustrasjoner av de tre fremtredende artene av cyanobakterier i Halsa-biofilmen: A. *Symplocastrum muelleri*, B. *Hapalosiphon intricatus*, C. *Stigonema turfaceum*. (Etter Skulberg et al., 2012, gjengitt med tillatelse fra tidsskriftet Biolog).



## Resultater

Observasjoner og tolkninger

Vi har foretatt aldersbestemmelse av biofilmen med det aktuelle organismesamfunnet (utført med arkeometrisk datering ved Ångströmlaboratoriet, Uppsala Universitet). Resultatet viste en alder av det organiske materialet målt til 140 år ( $^{14}\text{C}$ -alder BP). Dette gir et perspektiv på tidsdimensjonen og kontinuiteten som vegetasjonen med biofilmen (glyedannelsen) på beiteområdet til sauene har.

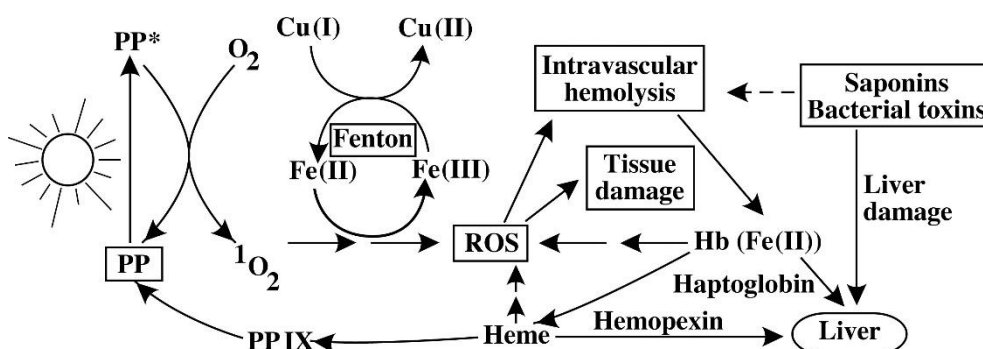
Diskusjon

Det var før 2007 helt ukjent at det forekommer potensielt giftige cyanobakterier på utmarksbeiter av denne typen. Dersom saueholdet og utmarksbeitingen skal fortsette i denne typen kystheier, må en se på dette som et varig problem for landbruket og matproduksjonen i disse områdene. Studiet av biofilmen og glyefenomenet via feltprøvene fra der organismesamfunnet har sitt naturlige leveområde og laboratoriedyrkingen av de relevante arter av cyanobakteriene, gir mulighet for innsikt i de særmerkede biologiske livsyttringene som alvelforskningen dreier seg om. Det er interessant å registrere at flere av de dominerende cyanobakteriene i biofilmen representerer arter som inngår i symbiose med sopp. Dette gjelder f.eks. slekten *Stigonema*, som i alvelforskningen peker seg ut med en sentral toksigen art. Arter innen *Stigonema* omfatter viktige fykobionter i lav. Noe karakteristisk for denne organismegruppen er nettopp nøysomhet og en tidkrevende vekstutvikling. Det er kontrastfylt å observere frodigheten av cyanobakteriene i glyesamfunnet under forsommerens vilkår i fjellet *in vivo*, samtidig som en registrerer deres sendrektighet i vekst *in vitro*. Dette årsaksforholdet må det forskes mer på. Sjukdommen alvelds naturbasis er ikke fullt klarlagt før de fysiske, økologiske og fenologiske omstendighetene den beror på, er forstått.

## Felling av toksiner in vitro

Tidligere studier av serum fra alveld-lam har resultert i en hypotese for hvordan fotosensibilitet oppstår *in vivo* (Figur 6) (Hegge et al., 2013). Inntak av toksiner og/eller saponiner fra beitevekster (f.eks. rome med glye) er antatt årsak til initiell leverskade, og kan påvirke grad av intravaskulær hemolyse og opptak av spormetaller som inngår i dannelsen av frie radikaler (fototoksitet). Som beskrevet ovenfor er det ønskelig å utvikle et produkt (bolus) som kan felle toksiner og saponiner slik at den initielle leverskaden kan forebygges. I denne delen av studiet har vi fokusert på felling av saponiner, men prinsippet kan også benyttes til felling av toksiner i kombinasjon med saponiner. Chitosan ble valgt som fellingsreagens.

Figur 6. Forenklet framstilling av mekanisme for utvikling av fototoksitet i sjukdommen alveld (Etter Hegge et al., 2013).



Reaktivt oksygen (ROS) kan genereres fra ulike kilder: Phytylporphyrin (PP) virker som en fotosensitizer (PS) og fører til produksjon av  $^1\text{O}_2$ , som igjen reagerer med biomolekyler og produserer ROS. Jern- og kopperioner kan være katalysatorer i en serie av lysuavhengige reaksjoner som produserer radikaler når ROS er til stede.

(Fenton reaksjonen). Økt intravaskulær hemolyse vil øke mengden hemoglobin (Hb) i blodet. ROS er generert gjennom oksydasjon av Hb til metHb (ikke vist i figuren), som kan dissosiere til heme og globin. Heme er en pro-oksidant og medvirker til ytterligere ROS-dannelse. Proteinene haptoglobin og hemopexin er en del av forsvarsmekanismene mot oksidativ skade forårsaka av Hb og heme. Forsvarsmekanismene kan bli forstyrret av en forøkt intravaskulær hemolyse. Det er mulig at jern i porphyrinkjernen av heme blir frisatt gjennom interaksjoner med heme oksygenase for å generere PP IX som virker som PS på samme måte som PP (Hegge et al., 2013).

Chitosan kan utvinnes av f.eks. rekeskall. Chitosan er et polykation med unike egenskaper, og kan blant annet brukes som et flokkuleringsmiddel og til felling av proteiner. Chitosan er biokompatibelt, og egner seg derfor godt i legemiddelformuleringer. Felling av saponiner med chitosan er beskrevet i litteraturen.

## Metode

Som en modell for saponiner ble det benyttet saponin fra quillaja-bark (Sigma-Aldrich, S4521). Et saponin består av et glykon og et aglykon. Glykonet er et sukker, mens aglykonet er et sapogenin (enten et nøytralt saponin med steroidstruktur, eller syre-saponiner med triterpenstruktur). Saponiner fra quillaja-bark har et sapogenininnhold på 20-35 % og er løselig opp til 50 mg/ml i deionisert vann. Som en mulig kvalitet av chitosan ble det benyttet chitosan medium molecular weight (Sigma-Aldrich, 448877) som er løselig i svake syrer og løsninger med pH lavere enn 6.

Ved utfelling av saponiner med chitosan vil det dannes et uløselig kompleks mellom de to komponentene. I dette studiet målte vi tap av chitosan etter utfelling og sentrifugering av prøven.

Med bakgrunn i rapporten om bolus (se ovenfor) ble det valgt ut en bolus på 4 cm til frisettingstudier av chitosan. Bolusene (spesiellaget ved *Sentralverkstedet* ved Institutt for biovitenskap, Universitetet i Oslo) hadde et tett lokk uten åpning i den ene enden, og et løst lokk som kunne limes på etter fylling av chitosan i den andre enden. I det løse lokket ble det laget et lite hull med diameter på henholdsvis 1,5, 1,9 og 2,5 mm slik at væske kan diffundere inn og oppløst chitosan diffundere ut. Bilde av bolus med 2,5 mm åpning er vist i bilde 10.

**Bilde 10.** Bilde av bolus med 2,5 mm åpning i lokket og fylt med chitosan (Foto: Geir Holm).



Kvantifisering av chitosan i løøsning

Det ble forsøkt ulike metoder for deteksjon av chitosan i løøsning, men de beste resultatene ble oppnådd ved kolorimetrisk kvantifisering av chitosan i løøsning bundet til et fargestoff. Metoden er basert på metode av Muzzarelli (1998) som benytter kompleksbinding mellom chitosan og det anioniske fargestoffet Cibacron brilliant red 3B-A kombinert med UV-spektroskopi (Muzarelli, 1998). De ulike reagensene som trengs for kvantifisering er listet opp i tabell 11.

**Tabell 12. Ulike reagenser til bruk ved kolorimetrisk kvantifisering av chitosan i løøsning**

Reagens	Tillaging
Chitosan standardløøsning	<b>Stamløøsning:</b> 0,5 g chitosan suspenderes i 50 ml demineralisert vann (Milli-Q vann) og røres i 30 minutter. 0,5 ml 100 % eddiksyre tilsettes for å løøse opp chitosan. Løøsningen fortynnes til 100 ml med Milli-Q vann. <b>Standardløøsning:</b> Stamløøsningen fortynnes ytterligere 10x med Milli-Q vann til 0,5 g/L.
Glysin HCl-buffer (0,1 M)	<b>Stamløøsning:</b> 1,87 g glysin og 1,46 g NaCl løøses i 250 ml Milli-Q vann. <b>Løøsning:</b> 81 ml av stamløøsningen overføres til ny målekolbe og fortynnes opp til 100 ml med Milli-Q vann. Ferdig Glysin HCl-buffer lages ny hver dag fra stamløøsning.
Fargereagens	<b>Stamløøsning:</b> 150 mg Cibacron brilliant red 3B-A (BR) løøses i 100 ml Milli-Q vann. <b>Løøsning:</b> 5 ml av stamløøsningen overføres til ny målekolbe og fortynnes til 100 ml med 0,1 M glysin HCl-buffer (sluttkonsentrasjon av fargestoff: 0,075 mg/ml). Fargereagens lages nytt hver dag fra stamløøsning.

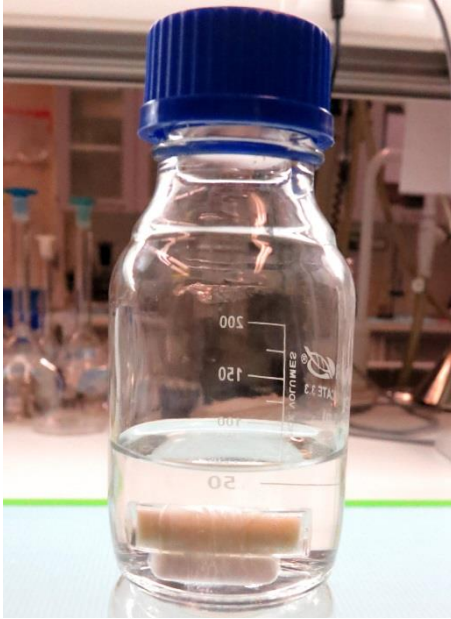
Inntil 300 µl av stamløøsning eller prøveløøsning med chitosan ble fylt i prøverør. Glysin HCl-buffer ble tilsatt slik at alle prøvene ble på totalt 300 µl. 3 ml av fargereagenset ble tilsatt røørene. En referanseløøsning ble tillaget med 300 µl glysin HCl-buffer og 3 ml fargereagens. Absorbansen ble målt ved 575 nm, da komplekset har et absorpsjonsmaksimum ved denne bøølgelengden.

Det ble også forsøkt å kvantifisere chitosan ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi. Tynnsjikt-platen ble sprayet med Lugols jodoppløøsning for dannelse av et farget kompleks mellom chitosan og jod. Flekkene ble kvantitert med en TLC-scanner (Nitschke et al., 2011). Denne metoden var ikke sensitiv nok til å skille mellom de aktuelle konsentrasjonene av chitosan, og metoden ble derfor ikke brukt i det videre arbeidet.

Frissetting av chitosan fra bolus i «simulert sauemage»

PH i nettmagen er vanligvis 6,7-7,2, men kan gå ned mot pH 5,8 etter føøring grunnet dannelse av kort-kjedede fettsyrer (eddiksyre, smøørsyre) og nedsatt produksjon av ammoniumioner (Sjaastad et al., 2003). For å sikre oppløøsning av chitosan og simulere pH i nettmagen etter føøring ble frissettingsforsøøk utført ved pH ca. 5,8. Mediet som simulerte magevæøken besto av 0,1 M acetatbuffer pH 5.76.

Bolusene ble fylt med chitosan (ca. 0,95 g). Sylindere ble lukket med et lokk med åpning på henholdsvis 1.5, 1.9 og 2.5 mm og festet til en magnet. Glassflasker med 100 ml acetatbuffer (0,1 M, pH 5.76) fungerte som «kunstig sauemage». En bolus med magnet ble lagt i hver flaske. Flaskene ble satt på en magnetrøører med svak omrøøring slik at bolusen lå og «duvet». Som referanse ble ca. 0,95 g chitosan tilsatt direkte i 100 ml acetatbuffer (0,1 M, pH 5.76) og satt til røøring under de samme betingelsene som bolus. Prøøver (1 ml) ble tatt ut til analyse ved ulike tidspunkt (4, 24, 48, 121, 192, 216, 288 og 312 timer). Hvert uttak ble erstattet med 1 ml buffer. Forsøøket ble utført ved 20°C. Forsøøksoppsettet er vist i figur 5.



Bilde 11. Forsøksoppsett for frisetting av chitosan fra bolus til simulert sauemage: øverste sylinder er bolus, nederste er magnetstav festet til bolus (Foto: Geir Holm).

Kvantifisering av løsningene ble gjort i henhold til kolorimetrisk bestemmelse av chitosan i løsning (se ovenfor). Fra uttaket på 1 ml ble det tatt ut 300  $\mu$ l til kvantifisering ved 575 nm. Konsentrasjonen av chitosan i de simulerte sauemagene ble utregnet fra standardkurve og summert opp kumulativt. Forsøkene ble utført med tre paralleller.

Det ble også forsøkt en metode beskrevet i den Europeiske Farmakopé med gjennomstrømningsceller, men denne metoden må optimaliseres før den kan benyttes til frisettingsforsøk fra bolus (Ph.Eur., 2016).

Flokkulering og utfelling av saponiner med chitosan

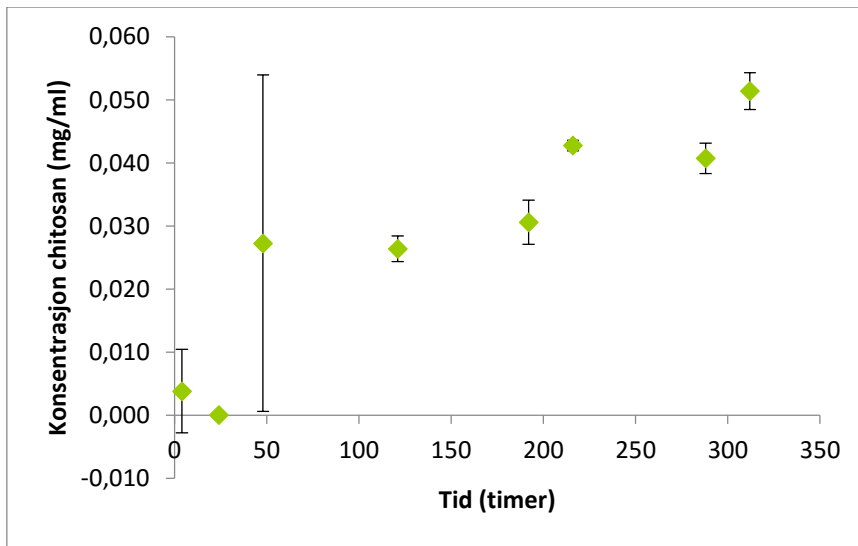
Ut i fra forsøkene med simulerte sauemager så det ut som om metningskonsentrasjonen for chitosan i acetatbufferen var ca. 1,7 mg/ml. Forsøkene med flokkulering og utfelling av saponiner ble utført med en konsentrasjon som var ca. 10 % av metningskonsentrasjonen.

0,5 ml chitosan (0,2 mg/ml) ble fylt i Eppendorfrør. 0,5 ml saponinløsning med ulik konsentrasjon ble tilsatt de samme rørene (medførte 1:1 fortykning av chitosan til maks 0,1 mg/ml). Løsningene ble sentrifugert ved 19283 x g/14000 rpm i 10 minutter med mikrosentrifuge. Det ble tatt uttak på 300  $\mu$ l fra supernatanten som ble overført til større sentrifugerør. Til disse ble det tilsatt 3 ml fargereagens i henhold til prosedyren for kolorimetrisk kvantifisering av chitosan i løsning (se ovenfor). Det ble utarbeidet en standardkurve i henhold til prosedyren. Forsøkene ble utført med tre paralleller.

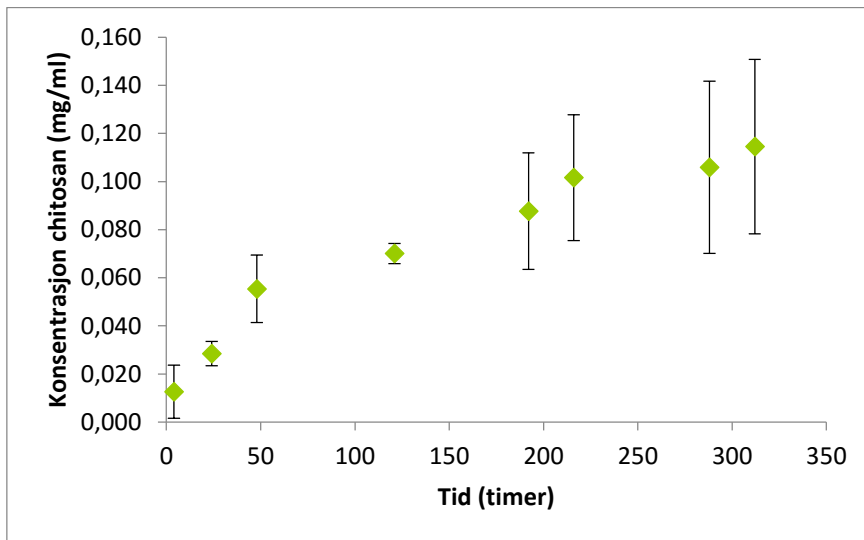
## Resultater

Figur 7-9 viser frisetting av chitosan fra bolus med åpning i lokket på henholdsvis 1,5, 1,9 og 2,5 mm. Som forventet vil diffusjon av chitosan fra bolus øke med økende diameter på åpningen. Siden chitosan vil swelle sakte og etterhvert løse seg i mediet, er det en viss mulighet for at det vil dannes en "gel-klump" av swullet chitosan i åpningen. Dette er sannsynligvis grunnen til de høye standardavvikene. Ingen av bolusene hadde frisatt mer enn ca. 25 % av chitosanmengden etter 2 uker. Etter at frisettingsforsøket var avsluttet tilsatte vi saponiner til løsningene og så en tydelig utfelling. Én av parallellene for bolus med 2,5 mm åpning så ut til å nå metningskonsentrasjonen (1,7 mg/ml) av chitosan i acetatbuffer pH 5.76 etter 13 dager.

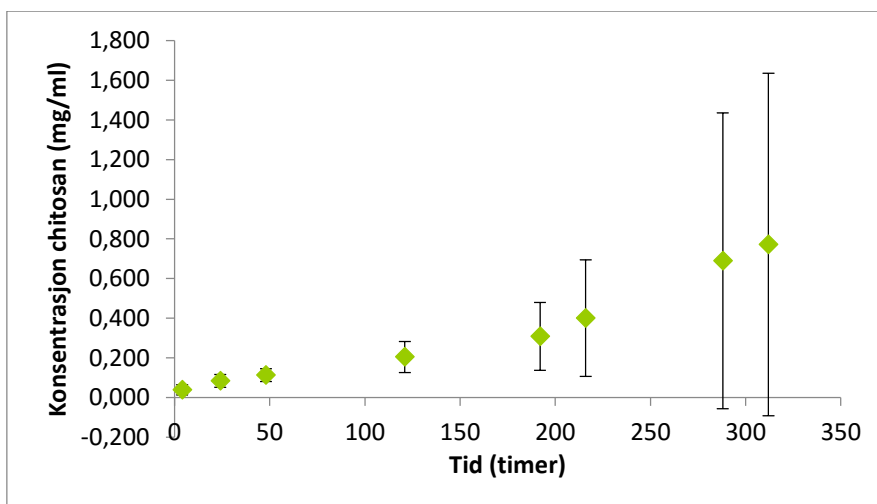
Figur 7. Frisetting av chitosan fra bolus med 1,5 mm åpning (n=3).



Figur 8. Frisetting av chitosan fra bolus med 1,9 mm åpning (n=3).



Figur 9. Frisetting av chitosan fra bolus med 2,5 mm åpning (n=3).

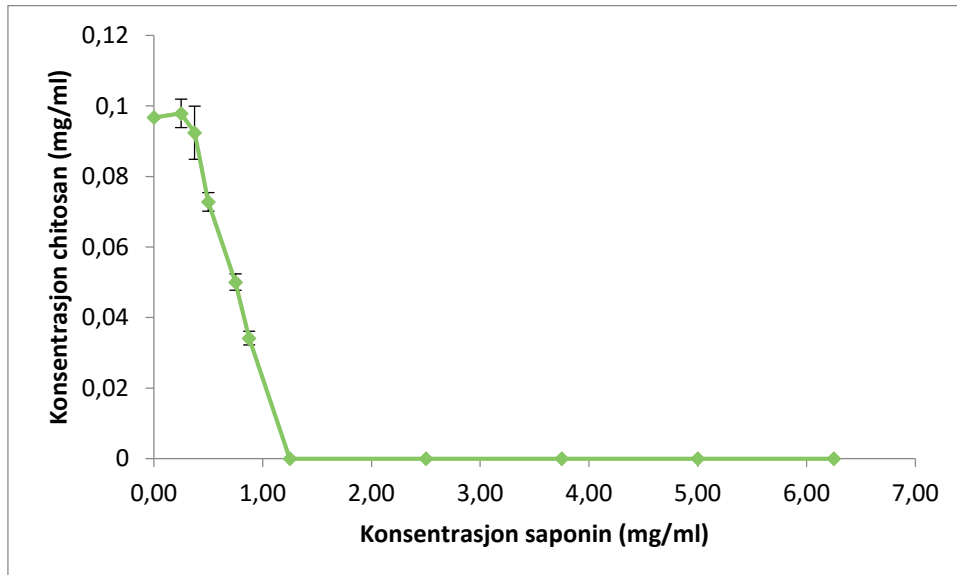


Flokkulering og utfelling av saponiner med chitosan

Ved tilsetning av en løsning med saponiner til en løsning med chitosan sees det en tydelig utfelling av saponiner (visuell observasjon). Det dannes et flokkulat som etterhvert sedimenterer mot bunnen av beholderen.

Figur 10 viser at en tilsetning av saponiner med høy konsentrasjon (1,25-6,25 mg/ml) gir 100 % tap av chitosan (0,1 mg/ml) i løsning. Målingene viser at en konsentrasjon på 0,1 mg/ml chitosan kan felle ut saponiner med en konsentrasjon på inntil 1,25 mg/ml (volum 1:1) under de valgte betingelsene før all chitosan er forbrukt.

Figur 10. Resultater fra flokkulering og utfelling av saponiner med chitosan (n=3).



## Diskusjon

Målet med denne delen av prosjektet var å undersøke potensialet til polykationet chitosan som et mulig utfellingsreagens for saponiner som blant annet finnes i romeplanten. Bolus ga en kontrollert frisetting av chitosan over tid, avhengig av diameteren på åpningen i lokket. Frisettingshastigheten kan derved kontrolleres ved å endre diameteren på åpningen. Det ble sett en tydelig utfelling ved tilsetning av en løsning med saponiner til en løsning med chitosan. En konsentrasjon av chitosan på 0,1 mg/ml feller ut inntil 1,25 mg/ml saponin (volum 1:1) under de gitte forholdene. Dette viser at en bolus med chitosan kan brukes til felling av saponiner i lam. En utfordring vil være løseligheten til chitosan. Lam utenom fôring har en pH på 6,7-7,2 i nettmagen, og chitosan har lav vannløselighet i dette pH-området. Etter fôring vil pH falle ned mot 5,8 og chitosan vil løses. Det må være tilstrekkelig chitosan løst i nettmagen til en hver tid, da en høy konsentrasjon av saponiner vil kunne "bruke opp" chitosan som er løst.

I et videre arbeid vil det være aktuelt å studere effekten av chitosan på aktuelle toksiner, eventuelt inkorporere andre fellende komponenter i bolus i tillegg til chitosan. Det er også interessant å se på ulike kvaliteter av chitosan og saponiner, eventuelt om et saponinekstrakt fra romeplanten vil gi den samme utfellingen med chitosan.



# Konklusjon

Arbeidet med å redusere sjukdom og tap på grunn av alveld og andre toksinbetinga sjukdommer hos beitedyr kan videreføres med ulike strategier.

Prosjektgruppen arbeider etter to hovedstrategier for om mulig å utvikle *forebyggende tiltak mot alveld*.

1. Bolus. Utviklingen av en bolus (depotbolus) er i prosjektet konsentrert om sjukdommen alveld. Arbeidet dreier seg imidlertid om en *generell metode* innenfor et utvidet konsept som kan omfatte andre veterinærmedisinske forhold. Bolus er derfor en *konkret metode* der arbeidet kan videreføres straks.

2. Kjemisk påvisning av faregrad. Dersom det lykkes konkret å bestemme det/de kjemiske levergiftige stoffene som er virksomt/virksomme når det gjelder alveld kan dette muliggjøre utviklingen av en *spesiell metode* i form av et «kit» som kan benyttes til å påvise faregraden i beitet. Når det gjelder alveld er nok dette en mulig løsning som ligger noe fram i tid.

Dette vil i tilfelle bli en parallell til bruk av en slik pakke (kit) på New Zealand som sauebønder kan kjøpe. Sauebonden kan med den selv måle sporettheten av den farlige soppen *Pithomyces chartarum*. (Den gir sjukdom og symptomer på lam som har stor likhet med dem vi ser hos alveld). Når sporemengden går over en viss grense må sauebonden enten straks sprøyte beitet mot sopp eller flytte sauen til et beite med mindre sporer.

For videre arbeid etter dette utredningsprosjektet, er det av interesse og se om toksinene som produseres av cyanobakterier og som nå antas å være hovedårsaken til sjukdommen alveld, kan bindes av lignende fellingsstoffer som andre kjente toksiner som gir sjukdom hos husdyr.

Videre vil det være interessant å se om det kan utformes førtilsetningsstoffer som både kan ha toksinbindingseffekt og som kan kombineres med andre ønskelige tilsetningsstoffer, eksempelvis vitaminer, mineraler eller naturlig forekommende bioaktive stoffer med antiparasittær og/eller antibakteriell effekt. Dette vil i så fall øke anvendelsesgraden og markedspotensialet for et slikt produkt.

Hovedkonklusjonen fra spørreundersøkelsen er at dødsårsaken hos lam på beite varierer mellom fylkene og at dette er særlig tydelig når det gjelder alveld. Videre er det et funn at saueeierne faktisk ikke er sikre på hva som er tapsårsaken for størstedelen av tapet av lam på beite. Det innebærer at det må tas et helhetsgrep for å redusere tap av lam på beite, og at tiltaka kan komme til å være svært individuelle alt etter hvor og hvordan beiteområdet til produsenten er. Tiltaka må være både forebyggende genetikk, forebyggende behandling og tidlig oppdagelse av sjukdom og rovdyrangrep også på utmarksbeite. Rask samling av sauene ved rovdyrangrep eller sjukdomsutbrudd, tidlig og riktig sjukdomsbehandling er viktige faktorer for å redusere tap av sau på beite. Slike tiltak krever ny kunnskap og nye metoder for å kunne kontrollere og behandle dyra på utmarksbeite. Vi ser derfor store muligheter med ulike typer bolus for toksinbinding og mineralforsyning, med sensorer for automatisk registrering av ulike fysiologiske parametre samt et målretta avlsarbeid for høyere overlevingsgrad på ulike beiter.

Som en del av disse to prosjektene har prosjektgruppen utarbeidet en skisse til et tre-årig forskningsprosjekt finansiert over Matfondavtalen 2017, der målet er å utvikle og teste forebyggende tiltak mot alveld og andre toksinbetinga sjukdommer i form av toksinbindende bolus.

# Publisering fra prosjektet

Nedenfor følger en oversikt over publikasjoner som er ferdigstilt i prosjektperioden og delfinansiert av prosjektet.

## Vitenskapelige publikasjoner:

MYSTERUD, I. 2015. BIOFILMER OG MIKROBIELLE MATTER. OM MIKROORGANISMERES TILPASNINGER OG ORGANISASJONSFORMER. BIOLOG 33 (2/3): 44-64.

MYSTERUD, I., KOLLER, G., HØILAND, K., CARLSEN, T. & SLETTEN, A. 2016. THE LAMB DISEASE ALVELD: SEARCH FOR FUNGI AND BACTERIA ON NARTHECIUM OSSIFRAGUM FOLIAGE AND ROOTS. SMALL RUMINANT RESEARCH 136: 179-186.

INNSENDT ELLER I ARBEID:

MYSTERUD, I., SKULBERG, O., LAANE, M., HJORTH TØNNESEN, H., & KARLSEN, J. 2016. UNRAVELLING A NEGLECTED BLANKET BOG BIOFILM IN COASTAL ECOSYSTEMS - WEST NORWAY. ECOHYDROLOGY & HYDROBIOLOGY; Ms. REF. NO. ECOHYD-D-16-00007. 40 PP MS MED FIGURER OG TABELLER. (UNDER REDAKSJONELL BEHANDLING).

MYSTERUD, I., WAAGE, S., KARLSEN, J., VULLUM, I., 2016. HUNTING THE CAUSE OF ALVELD: THE "GHOST DISEASE" DID NOT SHOW UP IN CONFINED LAMBS FED NARTHECIUM ON HIGH RISK PASTURES IN WEST NORWAY 2007. SMALL RUMINANT RESEARCH (INNSENDT).

MYSTERUD, I. & NUÑEZ, M. ADHESIVE TAPE SURVEYS OF FUNGAL SPORES ON WITHERED PLANT SURFACES FROM ALVELD HIGH-RISK AREAS IN HALSA/SURNADAL, MØRE OG ROMSDAL, NORWAY DURING JULY 2004. (UNDER REVISJON).

MYSTERUD, I., SKULBERG, O. M., LAANE, M., TØNNESEN, H. H., & KARLSEN, J. ALVELD AND CYANOBACTERIA: NEW HYPOTHESES FROM COASTAL BIOFILM STUDIES IN MØRE OG ROMSDAL, WEST NORWAY 2009 (UNDER UTARBEIDELSE).

## Populærvitenskapelig formidling:

Foredrag

6.APRIL 2016. FOREDRAG FOR SAUEBØNDER. RINDAL SAU OG GEIT. «PROSJEKTER PÅ SAU; ALVELD OG SJODOGG». LISE GRØVA

Artikler i fagblad og annen formidling

«KAN VI FOREBYGGE ALVELD HOS LAM PÅ BEITE? RAPPORT FRA PÅGÅENDE FORSKNING.» (UNDER UTARBEIDELSE TIL SAU OG GEIT OG NORSK LANDBRUK)

SAMMENDRAG AV PROSJEKTET (POWER POINT PRESENTASJON)

# Litteraturreferanser

- CARMICHAEL, W.W. (1992) *CYANOBACTERIA SECONDARY METABOLITES – THE CYANOTOXINS, A REVIEW*. JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY 72, 445-459.
- DE MIL, T., DEVREESE, M., DE SAEGER, S., EECKHOUT, M., DE BACKER, P., CROUBELS, S. (2016) *INFLUENCE OF MYCOTOXIN BINDERS ON THE ORAL BIOAVAILABILITY OF DOXYCYCLINE IN PIGS*. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 64, 2120–2126.
- DEWEY D.W., LEE, H.J, MARSTON, H.R. (1958) *PROVISION OF COBALT TO RUMINANTS BY MEALS OF HEAVY PELLETS*. NATURE 181: 1367-1371.
- DI MENNA, M.E., SMITH, B.L., MILES, C.O. (2009) *A HISTORY OF FACIALE ECZEMA (PHITOMYCOTOXICOSIS) RESEARCH*. NEW ZEALAND JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH 52, 345-376.
- D’MELLO, J. P. F. (1997) *HANDBOOK OF PLANT AND FUNGAL TOXICANTS*. NEW YORK, CRC PRESS.
- EBBESVIK, M., GRØVA, L., STRØM, T. (2012) *ØKOLOGISK SAUEHALD - KORT INNFORING*. BIOFORSK FOKUS 7 (7).
- EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM) (2011) *SCIENTIFIC OPINION ON THE RISKS FOR ANIMAL AND PUBLIC DOGLIOTTIHEALTH RELATED TO THE PRESENCE OF T-2 AND HT-2 TOXIN IN FOOD AND FEED*. EFSA JOURNAL 9, 2481
- FLÅØYEN, A. (1993) *STUDIES ON THE AETIOLOGY AND PATHOLOGY OF ALVELD WITH SOME COMPARISONS TO SPORIDESMIN INTOXICATION*. DR. MED. VET. THESIS. NORWEGIAN COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE, OSLO.
- FLÅØYEN, A. (2000A) *PLANT-ASSOCIATED HEPATOGENOUS PHOTOSENSITIZATION DISEASES*, pp. 204-219. IN: TU, A. T. & GAFFIELD, W. (EDS.): NATURAL AND SELECTED SYNTHETIC TOXINS. BIOLOGICAL IMPLICATIONS. WASHINGTON, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES 745, CHAP. 15.
- FLÅØYEN, A. (2000B) *PHOTOSENSITIZATION*, pp. 296-300 IN: MARTIN, W. B. & AITKEN, I. D. (EDS.) DISEASES OF SHEEP (3. ED.). OXFORD, BLACKWELL.
- GALEY, F.D., BEASLEY, V.R., CARMICHAEL, W.W., HOOSER, S.B., HASCHEK, W.M. (1987) *BLUE-GREEN ALGAE (MICROCYSTIS AERUGINOSA) HEPATOTOXICOSIS IN DAIRY COWS*. AM J VET RES 48 (9), 1415-20.
- GRØVA, L. (2011) *TICK-BORNE FEVER IN SHEEP -PRODUCTION LOSS AND PREVENTIVE MEASURES*, UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP, THESIS 2011:32.
- HEGGE, A. B., MYSTERUD, I., KARLSEN, J., SKULBERG, O. M., LAANE, C. M. M., SCHUMACHER, T., HJORTH TØNNESEN, H. (2013) *IMPAIRED SECONDARY OXIDANT DEACTIVATION CAPACITY IN SERUM FROM ALVELD AFFECTED LAMBS*. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY, 126 -134.
- HUDNELL, H. K. (ED.) (2008) *CYANOBACTERIAL HARMFUL ALGAL BLOOMS: STATE OF SCIENCE AND RESEARCH NEEDS*. NEW YORK, SPRINGER SCIENCE.
- HUISMAN, J., MATTHIJS, H. C. P., VISSER, P. M. (ED) (2005) *HARMFUL CYANOBACTERIA. AQUATIC ECOLOGY SERIES. NETHERLANDS, SPRINGER*.
- KEELER, R. F., TU, A. T. (ED.) (1983) *PLANT AND FUNGAL TOXINS. VOL 1. HANDBOOK OF NATURAL TOXINS*. NEW YORK, MARCEL DEKKER INC.
- LAANE, M., MYSTERUD, I., SKULBERG, O., SCHUMACHER, T. (2008) *BLÅGRØNNBakterier og andre mikroorganismer i en biofilm fra Nord-Møre. Har de alveld-relasjoner?* BIOLOG 26 (2), 8-23.

MORRIS, C.A., PHUA, S.H., CULLEN, N.G., TOWERS, N.R. (2013) *REVIEW OF GENETIC STUDIES OF SUSCEPTIBILITY TO FACIAL ECZEMA IN SHEEP AND DAIRY CATTLE*. NEW ZEALAND JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH 56, 156-170.

MUZZARELLI, R.A.A. (1998) *COLORIMETRIC DETERMINATION OF CHITOSAN*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 260, 255-257.

MYSTERUD, I. (2015) *BIOFILMER OG MIKROBIELLE MATTER: OM MIKROORGANISMERES TILPASNINGER OG ORGANISASJONSFORMER*. BIOLOG 33 (2/3), 44-64.

MYSTERUD, I., LAANE, M. (2008) *BLÅGRØNNBAKTERIER OG "SVARTE HULL" I ALVELDLAND*. BIOLOG 26 (1): 4-9.

MYSTERUD, I., VANG, M., NORTVEDT, S. (2003) *LAMMEDØDELIGHET 2001 OG TAPSSITUASJON 1999-2001 I ET ALVELD-OMRÅDE I HALSA/SURNADAL, MØRE OG ROMSDAL. MED EN OVERSIKT OVER HYPOTESER I ALVELDFORSKNINGEN*. UTMARKSNÆRING I NORGE 1-03: 1-127.

MYSTERUD, I., FLÅØYEN, A., LOADER, J. L., WILKINS, A. L. (2007) *SAPOGENIN LEVELS IN NARTHECIUM OSSIFRAGUM PLANTS AND OVIS ARIES LAMB FAECES DURING TWO ALVELD OUTBREAKS IN MØRE OG ROMSDAL, NORWAY, 2001*. VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS 31, 895-908.

MYSTERUD, I., KARLSEN, J., WAAGE, S. & VULLUM, I. (2008A) *JAKTEN PÅ ALVELDENS "MISSING LINK" (13). INGEN LAM FIKK ALVELD I HALSA-EKSPERIMENT*. SAU OG GEIT 61 (5), 56-59.

MYSTERUD, I., KARLSEN, J., WAAGE, S. & VULLUM, I. (2008B) *JAKTEN PÅ ALVELDENS "MISSING LINK" (14). ETTER ET "MISLYKKET" HALSA-EKSPERIMENT*. SAU OG GEIT 61 (6), 58-61.

MYSTERUD, I., SKULBERG, O., LAANE, M., SCHUMACHER, T., KARLSEN, J., HJORTH TØNNESEN, H. (2008C) *I MØREFJELLA PÅ LETING ETTER ALVELDGIFTENS KILDER*. BIOLOG 26 (4), 44-56.

MYSTERUD, I., SCHUMACHER, T., KARLSEN, J., HJORTH TØNNESEN, H., LAANE, C. M. M. & SKULBERG, O. M. (2011 A) *ALVELD OG ALVELDFORSKNING*. INTERNETT RAPPORT. LANDBRUKSKONTORET, FYLKESMANNEN I MØRE OG ROMSDAL.

MYSTERUD, I., SCHUMACHER, T., KARLSEN, J., HJORTH TØNNESEN, H., LAANE, C. M. M. & SKULBERG, O. M. (2011 B) *JAKTEN PÅ ALVELDENS "MISSING LINK" (15)*. SAU OG GEIT 64 (5), 53-57.

MYSTERUD, I., SCHUMACHER, T., KARLSEN, J., HJORTH TØNNESEN, H., LAANE, C. M. M. & SKULBERG, O. M. (2012) *JAKTEN PÅ ALVELDENS "MISSING LINK" (16). FOKUS PÅ BLÅGRØNNBAKTERIER*. SAU OG GEIT 65 (1), 52-57.

MYSTERUD, I., SKULBERG, O. M., LAANE, M., TØNNESEN, H. H., KARLSEN, J. (2016) *UNRAVELLING Å NEGLECTED BLANKET BOG BIOFILM IN COASTAL ECOSYSTEMS – WEST NORWAY*. ECOHYDROLOGY & HYDROBIOLOGY, INNSENDT.

NAMIKOSKI, M., RINEHART, K.L. (1996) *BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY CYANOBACTERIA*. JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY 17, 373-384.

NITSCHKE, J., ALTENBACH, H.J., MALOLEPSZY, T., MÖLLEKEN, H. (2011) *A NEW METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF CHITIN AND CHITOSAN IN EDIBLE MUSHROOMS*. CARBOHYDRATE RESEARCH 365, 1307-1310.

OSSELAERE, A., DEVREUSE, M., WATTEYN, A., VANDENBROUCKE, V., GOOSSENS, J., HAUTEKIET, V., EECKHOUT, M., DE SAEGER, S., DE BAERE, S., DE BACKER, P., CROUBELS, S. (2012). *EFFICACY AND SAFETY TESTING OF MYCOTOXIN-DETOXIFYING AGENTS IN BROILERS FOLLOWING THE EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY GUIDELINES*. POULTRY SCIENCE 91, 2046-2054.

PITT, J. F., HOCKING, A. D. (2009) *FUNGI AND FOOD SPOILAGE*. (3 ED.) NEW YORK, SPRINGER.

PUSCHNER, B., GALEY, F. D., JOHNSON, B., DICKIE, C.W., VONDY, M., FRANCIS, T., HOLSTEGE, D.M. (1998) *BLUE-GREEN ALGAE TOXICOSIS IN CATTLE*. J AM VET MED ASSOC. 213(11), 1605-7, 1571.

REKDAL, Y. (2013) *BEITE I UTMARK – KVALITET OG KAPASITET*. BIOFORSK FOKUS 8(2), 135-137.

SJAASTAD, Ø.V., HOVE, K., SAND, O. (2003) *PHYSIOLOGY OF DOMESTIC ANIMALS*. SCANDINAVIAN VETERINARY PRESS, OSLO.

SKULBERG, O. M. (2013) *BLÅGRØNNALGENES BETYDNING I BIOLOGISK TAKSONOMI OG SYSTEMATIKK*. BIOLOG 31, 34-43.

SKULBERG, O. M., MYSTERUD, I. (2012) *STUDIER AV ALGESLIM (GLYE) I ET IMPEDIMENT-ØKOLOGISK PERSPEKTIV*. BIOLOG 30 (2), 12-24.

SKULBERG, O., MYSTERUD, I., KARLSEN, J., HJORTH TØNNESEN, H., LAANE, C. M. M., SCHUMACHER, T. (2012) *ALVELDFORSKNING ANNO 2012: SØKELYS PÅ CYANOBAKTERIER VI VET LITE OM*. BIOLOG 30, 32-41.

SØRHEIM, K. (2010) *BEITEPROSJEKTET I MØRE OG ROMSDAL 2010 - SJKDOM SOM ÅRSÅK TIL LAMMETAP I MØRE OG ROMSDAL - BIOFORSK REPORT VOL. 6 NR. 27 2010*

TØNNESEN, H. H., MYSTERUD, I., KARLSEN, J., SKULBERG, O. M., LAANE, C. M. M., SCHUMACHER, T. (2010) *DETECTION OF SINGLET OXYGEN IN BLOOD SERUM SAMPLES OF CLINICALLY HEALTHY LAMBS SUFFERING FROM ALVELD DISEASE*. VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS 34 (4), 347-357.

TØNNESEN, H. H., MYSTERUD, I., KARLSEN, J., SKULBERG, O. M., LAANE, C. M. M., SCHUMACHER, T. (2012) *IDENTIFICATION OF SINGLET OXYGEN PHOTOSENSITIZERS IN LAMB'S DRINKING WATER IN AN ALVELD RISK AREA IN WEST NORWAY*. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY, 37-45.

Forfattere: Kristin Sørheim, Emma Brunberg, Lise Grøva, Unni Støbet Lande, Marianne Lilletvedt  
Tovsen, Kristin Gjestvang Grønlien, Hanne Hjorth Tønnesen, Jan Karlsen, Olav Skulberg, Ivar  
Mysterud.



# Vedlegg 1

## Spørreundersøkelse

### Sykdom og dødsårsaker for beitesesongen 2014

Bioforsk Økologisk, Tingvoll, har som mål å utvikle forskningsprosjekt som på sikt skal bidra til å redusere tap av beitende dyr gjennom både forebyggende tiltak, rask avdekking av sykdom/rovdyr samt effektiv behandling. Som en start og for å kunne utvikle et praktisk prosjekt til nytte for produsentene, trenger vi mer kunnskap om sykdom og dødsårsaker for beitesesongen 2014. Vi håper derfor du vil hjelpe oss med å besvare denne spørreundersøkelsen om din produksjon. Spørreundersøkelsen består av 49 spørsmål og vi forventer at den tar maks 30 min å gjennomføre. Ingen av opplysningene spres videre og alle svar/resultater anonymiseres i videre bruk. Det er en fordel å ha produksjonsdata for 2014 lett tilgjengelig ved utfylling av undersøkelsen.

Vi håper du tar deg tid til å besvare så nøyaktig som mulig, da dine svar er viktige for det videre arbeidet for en bærekraftig og økonomisk lammeproduksjon!

#### 1) Er du medlem av et beitelag? I så fall hvilket?

#### 2) Hvor mange vinterfora dyr hadde du sesongen 2014? (tall per 1.1.2014, oppgi også antall lam som bare er satt på for oppføring til slakt våren 2014)

#### 3) Hvilke raser var de voksne dyrene (påsett-dyr)? Angi antall for hver rase (feks: NKS: 35 stykk)

#### 4) Hvor mange voksne dyr døde i 2014? (antall døde inne, antall døde på beite)

#### 5) Hvor mange lam ble født sesongen 2014?

#### 6) Hvilke raser var lammene? Angi antall for hver rase (feks NKS: 35 stykk)

#### 7) Hvor mange lam døde i 2014?

#### 8) Benytter du deg av vaksiner og/eller annen forebyggende behandling mot sykdom (f.eks. koksidier, innvollsparasitter, flått)? I så fall hvilke vaksiner og/eller forebyggende behandling ble gjennomført i 2014?



#### 9) VÅRBEITEPERIODEN PÅ INNMARK 2014

**10) Fra hvilken dato ble dyrene sluppet på vårbeite?**

**11) Hvor mange lam døde i løpet av vårbeiteperioden?**

**12) Etter din oppfatning, hvor vanlig er det at lammene døde pga. flåttsykdom på vårbeite 2014?**

- Flåttsykdom var hoveddødsårsaken på innmark (anslår at over 50% døde på grunn av flått)
- Flåttsykdommer var en vanlig dødsårsak på innmark (anslår at 25 - 50% døde på grunn av flått)
- Flåttsykdommer forekommer som dødsårsak på innmark (anslår at 1-24% døde på grunn av flått)
- Ingen lam døde av flåttsykdommer på innmark (anslår at 0% døde på grunn av flått)

**13) Etter din oppfatning, hvor vanlig er det at lammene døde pga. alveld på vårbeite 2014? (siden alveld ikke oppstår på vårbeite er dette spørsmålet bare med for det systematiske oppsettet av spørsmål)**

- Alveld var hoveddødsårsaken på innmark (anslår at over 50% døde på grunn av alveld)
- Alveld var en vanlig dødsårsak på innmark (anslår at 25 - 50% døde på grunn av alveld)
- Alveld forekommer som dødsårsak på innmark (anslår at 1-24% døde på grunn av alveld)
- Ingen lam døde av alveld (anslår at 0% døde på grunn av alveld)

**14) Etter din oppfatning, hvor vanlig er det at lammene døde pga. andre sykdommer på vårbeite 2014?**

- Andre sykdommer var hoveddødsårsaken på innmark (anslår at over 50% døde på grunn av andre sykdommer)
- Andre sykdommer var vanlig dødsårsak på innmark (anslår at 25 - 50% døde på grunn av andre sykdommer)
- Andre sykdommer forekommer som dødsårsak på innmark (anslår at 1-24% døde på grunn av andre sykdommer)
- Ingen lam døde av andre sykdommer (anslår at 0% døde på grunn av andre sykdommer)







[www.norsok.no](http://www.norsok.no)



Norsk senter for økologisk landbruk, NORSØK er ei privat, sjølvstendig stifting.  
Stiftinga er eit nasjonalt senter for tverrfagleg forskning og kunnskapsformidling for å utvikle økologisk landbruk.

NORSØK skal bidra med kunnskap for eit meir berekraftig landbruk og samfunn.  
Fagområda er økologisk landbruk og matproduksjon, miljø og fornybar energi.

Norsk senter for økologisk landbruk / Gunnars veg 6 / NO-6630 TINGVOLL / Telefon: +47 930 09 884 / E-post: [post@norsok.no](mailto:post@norsok.no)