

Metodik för bakteriologisk provtagning från näshålan på får

Marta Fjällström

**Handledare: Charina Gånheim
Inst. för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Kerstin de Verdier
SVA**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	4
Summary	4
Inledning	5
Litteraturoversikt	5
Respiratorisk sjukdom hos får	5
Mannheimia haemolytica.....	5
Andra bakteriella agens	6
Virus.....	8
Parasiter - Lungmask	9
Provtagningsmetodik	9
Material och metoder	10
Projektets upplägg.....	10
Besättningsinformation.....	10
Provtagning i fält	11
På laboratoriet	12
Resultat	13
Kliniska symtom	13
Provtagningsresultat.....	13
Diskussion.....	16
Litteraturförteckning	18

SAMMANFATTNING

Infektioner i luftvägar och lungor är en av de största orsakerna till sjukdom och förlust inom fårnäringen globalt sett. Under 2008 startade SVA och Fårhälsovården inom Svenska Djurhälsovården ett projekt om luftvägsinfektioner hos svenska får och som en inledande del i det projektet uppdrogs till mig att undersöka olika möjligheter för provtagning med fokus på nässvabbar.

Studien består dels av en litteraturstudie avseende vilka agens som orsakar luftvägsinfektioner på får samt förekommande provtagningsmetodik, och dels av en experimentell studie bestående av 56 får som provtagits med nässvabbar, både oskyddad och med hjälp av en skyddande hylsa.

Någon metodik för skyddad provtagning fanns inte före studiens start så projektet inleddes med utarbetandet av en hylsa som skyddar provtagningspinnen mot kontaminerande bakterier under in- och utförandet i näshålan.

Resultatet visade att 69 % av nässvabbsproverna uppvisade en renare växt om de var tagna med en skyddande hylsa. Totalt hittades 11 isolat av *M. haemolytica* och samtliga av dessa var penicillinkänsliga vid antibiotikaresistensbestämning. Bärarprevalensen av *M. haemolytica* hos de sjuka fåren varierade mellan 5-40 %.

SUMMARY

Respiratory infections are one of the major causes of disease in sheep throughout the world. In the beginning of 2008 the Swedish National Veterinary Institute and the Swedish Animal Health Service together started a project about respiratory infections in Swedish sheep. This study is an initial part of that project and the aim of this study was to investigate different sampling possibilities with focus on nasal swabs.

This study is composed partly of a literature review on causative agents of respiratory infections in sheep and existing sampling methods, and partly of an experimental study comprising 56 sheep. These sheep were sampled with both an ordinary nasal swab and a guarded nasal swab.

Before the start of this study there was to our knowledge no described method for sampling sheep with a guarded swab. Because of that the study started with composing a case which protects the swab from contaminating bacteria during entrance and exit of the nasal cavity.

The results showed that 69 % of the samples demonstrated a cleaner growth if they were taken with a guarded swab. Totally 11 isolates of *M. haemolytica* were found and all of them were sensitive for penicillin. The carrier prevalence for *M. haemolytica* in the diseased sheep varied between 5 and 40 %.

INLEDNING

Den litteratur som finns om vilka agens som orsakar luftvägslidande hos får är utländsk och kunskap om vilka agens som är aktuella hos får i Sverige saknas. Med anledning av detta startade SVA och Fårhälsovården inom Svenska Djurhälsovården i början av 2008 ett projekt om luftvägsinfektioner hos svenska får. Som en inledande del av projektet uppdrogs till mig att undersöka olika möjligheter för provtagning med fokus på nässvabbar.

Huvudsyftet med min studie var att undersöka vad det finns för metodik för bakteriologisk provtagning i nashålan på får, där provtagningspinnen kan förhindras från att kontamineras av bakterier från yttre delarna av näsborren. Samt att, om en sådan metod med skyddad provtagningspinne finns, undersöka om det blir någon skillnad om man använder denna jämfört med en oskyddad provtagningspinne vid nässvabbsprovtagning.

Dessutom fanns ett intresse för att undersöka vilka patogena bakteriestammar som förekommer i nashålan på sjuka får i Sverige och hur dessa stammars antibiotikaresistensmönster ser ut.

LITTERATURÖVERSIKT

Respiratorisk sjukdom hos får

Infektioner i luftvägar och lungor är en av de största orsakerna till sjukdom och förlust inom fårnäringen globalt sett (Ackermann & Brogden, 2000). Även i Sverige är infektioner i luftvägar och lungor ett problem inom fårnäringen. Fårhälsoveterinärerna upplever att det förekommer en hel del problem med hosta och lunginflammationer hos får och att de inte har någon klar bild över etiologin. I Norge uppges lunginflammationer vara ett vanligt problem hos får. Lunginflammation utgör cirka tio procent av obduktionsdiagnoserna och i vissa flockar har man vid slakt konstaterat lunginflammationer på upp till 20-25 procent av djuren (Vatn *et al.*, 2008).

Ett av de främsta kliniska symtomen på respiratorisk sjukdom är hosta, men även näsflöde och snabb andning är vanliga symtom (Lamontagne *et al.*, 1985).

Nedan följer en genomgång av vanliga agens som orsakar luftvägsinfektioner hos får.

Mannheimia haemolytica

M. haemolytica är en av de viktigaste luftvägspatogenerna hos unga idisslare men är också en mycket viktig faktor för insjuknande hos vuxna djur (Ackermann & Brogden, 2000). Bakterien ingår i normalfloran och kan isoleras från nashålan hos friska får (Sheehan *et al.*, 2005). Allt från 0 % till 40 % av fåren är friska bärare av bakterien (Al-Tarazi 1997, Poulsen *et al.*, 2006) men det finns exempel där ända upp till 90 % av fåren var friska bärare (Biberstein *et al.*, 1970). Biberstein *et al.* (1970) fann att det i Storbritannien förekommer två toppar under året då flest får är bärare av bakterien. Den ena toppperioden är juni-juli och den andra är i november. Andelen

bärare vid sjukdomsutbrott i flocken varierar från 17,8 % ända upp till 96,7 % (Shreeve, *et al.*, 1972).

Det finns 12 olika serotyper av *M. haemolytica*. Vilka som är de vanligast förekommande verkar variera från land till land. (Biberstein *et al.*, 1970, Donachie, 2007, Fodor *et al.*, 1999). Det verkar även vara så att i flockar med sjukdomsutbrott är det ett mindre spektrum av serotyper involverade jämfört med hos friska flockar (Shreeve, *et al.*, 1972). I flockar med utbrott är incidensen för den dominerande serotypen mycket högre än den genomsnittliga incidensen för den serotypen i en normal flock (Shreeve, *et al.*, 1972).

För att bakterien ska orsaka sjukdom krävs någon form av immunnedsättande faktor. Denna faktor består ofta i någon form av stress, t.ex. värme, trängsel, dåligt väder, höga nivåer av damm och stallångor, transport, kastration, avvänjning, foderbyte, högt parasittryck, etc. (Brogden *et al.*, 1998, Winter & Charnley, 1999). Men även andra virus- och bakterieinfektioner som t.ex. *Mycoplasma ovipneumoniae* och parainfluenzavirus typ 3 kan öppna vägen för pneumoni med *M. haemolytica* (Alley *et al.*, 1999, Hendersson, 1990). Det är alltså först efter någon typ av predisposition som *M. haemolytica* blir en opportunistisk patogen (Brogden *et al.*, 1998).

Vid obduktion av ett mycket stort antal får isolerades *M. haemolytica* ensamt från 51.6% av lunginflammationerna och ytterligare 26 % av de obducerade djuren med lunginflammation uppvisade samtidig växt av både *M. haemolytica* och *M. ovipneumoniae* (Hazirolu *et al.*, 1994).

De kliniska symtomen på akut lunginflammation orsakad av *M. haemolytica* är anorexi, nedsatt allmäntillstånd, feber, dyspné och ökad andningsfrekvens. Vid auskultation hörs förstärkta andningsljud. Drabbade får uppvisar även ofta ögon- och näsflöde. I vissa fall dör djuren utan att visa några föregående symtom. Diagnosen säkerställs vid obduktion då man kan se typiska lunglesioner och även odla ut bakterien från exsudat (Donachie, 2007).

De flesta utbrott i Europa sker i maj, juni och juli. Utbrotten startar ofta med att några djur dör i septikemi, oftast lamm. Morbiditet och mortalitet varierar. Det finns inga tillgängliga data för morbiditet men mortaliteten uppges vara ca två procent, uträknat på 450 utbrott (Donachie, 2007). Mortaliteten kan dock vara högre i enstaka flockar, ända upp till 20 % (Shreeve, *et al.*, 1972). Det verkar vara vanligare med utbrott vissa år, vilket kanske kan förklaras av väderleksfaktorer eller att immunitet mot virusinfektioner ofta varierar i cykler. Sporadiska fall med lunginflammation förekommer också (Donachie, 2007).

Andra bakteriella agens

Mycoplasma ovipneumoniae

M. ovipneumoniae isolerades första gången 1974 och ger en atypisk eller icke-progressiv pneumoni hos får (Ayling & Nicholas, 2007). Andra författare menar att det är först i kombination med *M. haemolytica* som det kallas atypisk pneumoni

(Brogden *et al.*, 1998). Oavsett terminologi så ökar infektion med *M. ovipneumoniae* risken för sekundärinfektion med *M. haemolytica*. Låga nivåer av *M. ovipneumoniae* kan ses i lungorna även på friska individer (Ayling & Nicholas, 2007). *M. ovipneumoniae* isolerades vid obduktion från ett stort antal djur med lunginflammationer, hos 43 % av fallen (Hazioglu *et al.*, 1994).

Kliniska tecken på sjukdom är oftast milda, men påverkar ofta tillväxten negativt och orsakar därmed produktionsförluster (Brogden *et al.*, 1998). Infektionen kan dock ge allvarligare symtom med akut fibrinös pneumoni och i vissa fall död. Mortaliteten brukar dock vara låg medan morbiditeten ofta är hög. Lamm under ett år drabbas oftast vid utbrott. De första kliniska symtomen brukar vara hosta, temperaturstegring, inappetens och minskad tillväxt. De viktigaste kliniska symtomen är dock kronisk persisterande hosta som i svåra fall kan orsaka rektumprolaps, samt mukopurulent nosflöde. Definitiv diagnos ställs vid obduktion genom odling från lungmaterial. I samband med sjukdomsutbrott kan man dock ta serologiska prover, för att leta efter titerstegring, alternativt ta nässvabbar eller utföra bronkoalveolär sköljning. Bakterien kan finnas normalt i luftvägarna så titerstegring vid ett utbrott är troligen den mest tillförlitliga metoden för att ställa diagnos på levande djur (Ayling & Nicholas, 2007).

Lammen smittas troligen med *M. ovipneumoniae* från tackorna ett par dagar efter födseln, därefter tar det 5-10 veckor innan sjukdomen har progredierat och visar sig kliniskt. Utbrott kan också ske när man blandar olika grupper av djur. Det finns många olika stammar av bakterien och immunitet mot en stam verkar inte ge immunitet mot andra (Ayling & Nicholas, 2007).

Bra ventilation och låg flocktäthet är viktigt för att förebygga sjukdom. Behandling vid utbrott är antibiotika som oxytetracykliner, flourokinoloner eller makrolider. Ett flertal utbrott har de senaste åren noterats i flockar vaccinerade mot *M. haemolytica*, varför vaccin mot *M. ovipneumoniae* också är önskvärt (Ayling & Nicholas, 2007).

Bordetella parapertussis

Bordetella parapertussis är en bakterie som också har isolerats från fårlungor och antas spela en roll vid pneumonier. Troligen predisponerar denna bakterie för infektion med *M. haemolytica*, vilket även visats experimentellt (Brogden *et al.*, 1998). *B. parapertussis*infektion ger en minskning av alveolarmakrofagernas fagocytära kapacitet och därmed minskar deras förmåga att döda *M. haemolytica* (Donachie, 2007).

Pasteurella multocida

Enligt Donachie (2007) är det sällsynt att *P. multocida* orsakar pneumoni och väldigt lite är känt om epidemiologin. Infektionen beskrivs bara som förekommande men väldigt lite verkar vara känt om den (Brogden *et al.*, 1998).

Virus

En rad olika virus uppges i litteraturen kunna orsaka akut luftvägsinfektion hos får. Dessa är: parainfluensavirus typ 3, reovirus, respiratoriskt syncytialt virus, adenovirus och herpesvirus (Brogden *et al.*, 1998, Winter & Carnley, 1999) Samtliga virusinfektioner ökar mottagligheten för sekundär bakteriell infektion och då framför allt *M. haemolytica*. Virusinfektionerna gör detta genom att de påverkar den mucociliära clearancemekanismen, som i normala fall ska eliminera invaderande organismer från nedre luftvägarna (Brogden *et al.*, 1998).

Maedi-visna och jaagsiekte är virussjukdomar som kan ge kroniskt progredierande pneumonier (Winter & Carnley, 1999).

Parainfluensavirus typ 3

Det finns bara en serotyp av ovint parainfluensavirus. De flesta infektionerna är milda eller subkliniska men akuta utbrott med hög morbiditet kan förekomma. Sjukdomen förlöper oftast utan feber, men med hosta och seröst näsflöde. Viruset kan isoleras från nässvabb under de första sex dagarna av infektionen. En ökning av serumantikroppar kan också ses, men bör inte användas som diagnostik då det inte alltid sker en antikroppsstegring till följd av infektionen (Sharp & Nettleton, 2007). Det verkar som infektion med parainfluensavirus typ 3 (PIV-3) är vanligt då 28-80% av fåren bär på antikroppar (Lamontagne *et al* 1985, Sharp & Nettleton, 2007). Även om infektion med PIV-3 i de flesta fall passerar obemärkt kan det predisponera för infektion med *M. haemolytica* och då orsaka allvarlig sjukdom (Sharp & Nettleton, 2007).

Får av rasen Dorset verkar vara känsligare för infektioner med PIV-3 (Lamontagne *et al* 1985). Det har gjorts fältförsök med ett intranasalt vaccin mot PIV-3 som verkar minska prevalensen pneumonier (Sharp & Nettleton, 2007).

Adenovirus

Det finns idag sex olika serotyper av fåradenovirus (OadV) samt även två serotyper av bovina adenovirus (BadV-2 och -7) som har isolerats från får. Viruset kan isoleras från friska djur men hittas ändå huvudsakligen från djur med klinisk sjukdom (Brogden *et al.*, 1998). Sharp och Nettleton (2007) menar däremot att viruset kan isoleras från allvarligt sjuka djur med kraftig pneumoni, men att de flesta isolaten kommer från friska lamm. Antikroppsprevalensen varierar mellan 20-70 % och de flesta infektioner sker före lammen har uppnått ett års ålder. Viruset kan ibland isoleras från övre luftvägarna om inte hela flocken har antikroppar, men kan även isoleras i faeces. Adenovirus kan orsaka persistenta infektioner där de infekterade djuren kan utsöndra virus upp till 80 dagar efter infektion. Detta är troligen en viktig orsak till att infektionen upprätthålls i flocken (Sharp & Nettleton, 2007).

Vilka av serotyperna som anses orsaka sjukdom varierar mellan olika källor. Vissa anger att fem av de ovan nämnda serotyperna experimentellt visats orsaka sjukdom (Sharp & Nettleton, 2007) medan andra menar att endast tre har bevisats göra det (Brogden *et al.*, 1998).

Respiratoriskt syncytialvirus

Respiratoriskt syncytialvirus (RSV) har isolerats från får, men att det finns en koppling till klinisk sjukdom är inte lika säkerställt. Får som naturligt blivit infekterade med RSV har rapporterats uppvisa mild rhinit (Brogden *et al.*, 1998). I en kanadensisk studie fann man att 35% av fåren var seropositiva för RSV-antikroppar (Lamontagne *et al* 1985).

Övriga virus, herpesvirus och reovirus verkar ha liten praktisk betydelse jämfört med de andra virusen (Brogden *et al.*, 1998). I Kanada var seroprevalensen hos får 0 % för herpesvirus och 72 % för reovirus (Lamontagne *et al* 1985).

Parasiter - Lungmask

Lungmask har inte lika stor betydelse på får som det har på nöt. Endast 7,3 % av luftvägsdiagnoserna vid obduktion utgörs av lungmask. Sjukdomen är vanligast på hösten och början av vintern och är mest ett problem i områden där det är varmt och fuktigt. Det finns ett antal olika parasiter som kan angripa fårlungor ur familjerna Dictyocaulidae och Protostrongylidae. Sjukdomen drabbar mest unga får och vanligaste symtomet är hosta (Malone, 2007).

Provtagningsmetodik

Litteraturen är mycket kluven inom detta område. De principiellt olika metoderna är nässvabb, lungsköljning och postmortemprovtagning.

DeRosa *et al* (2000) fann att agens från nässvabbsodling i 70 % av fallen var identisk med det i lungorna sjukdomsframkallande agens hos sjuka kalvar. Shreeve *et al* (1972) fann att i 91 % av fårflockarna med sjukdomsutbrott orsakat av *M. haemolytica* överensstämde serotypen funnen i lungorna vid postmortemprovtagning med den dominerande serotypen funnen via nässvabb. Även Odugbo *et al* (2004) visade god korrelation mellan nässvabb och agens isolerade från lungorna vid obduktion. Andra menar att nässvabbsprovtagning är mer eller mindre meningslöst (Sheehan *et al.*, 2005).

Sheehan *et al* (2005) har utvecklat en teknik för transtrakeal sköljningsprovtagning på får som de menar visar god korrelation till klinisk sjukdom. I den studien jämförs transtrakeal provtagning och provtagning via nässvabb. Resultatet verkar dock visa på att viruskorrelationen var starkare än den bakteriologiska. *M. haemolytica* isolerades i mindre utsträckning från prover tagna via den transtrakeala tekniken jämfört med nässvabb hos både sjuka och friska djur.

Boudewijn (2006) påpekar att provtagning via nässvabb inte ska nedvärderas, att det är ett värdefullt verktyg som är bättre än att inte ta några prover alls.

Jag har inte hittat någon studie där man använt sig av skyddad provtagare vid nässvabbsprovtagning.

Det stora diagnostiska problemet är att i princip samtliga av de sjukdomsframkallande bakteriologiska patogenerna även kan förekomma i normalfloran hos kliniskt friska får (Poulsen *et al.*, 2006, Mohan *et al.*, 1992, Sheehan *et al.*, 2005).

MATERIAL OCH METODER

Projektets upplägg

Under den första delen av projektet gjordes en undersökning för att utröna om det redan existerar någon form av hylsa eller annan konstruktion som kan användas för skyddad provtagning i näshålan på får. Veterinära produktföretag samt humanmedicinska kliniker kontaktades. Då ingen sådan produkt hittades påbörjades ett arbete för att utarbeta en egen metod för skyddad provtagning. Efter att ha provat några olika material valdes till slut en slang av mjuk plast ut (kylarslang från Jula). Slangen kapades i 11 cm långa bitar efter att ha utprovats för att passa får i olika storlekar, se figur 1 (två fårskallar i olika storlek från slakteriet i Uppsala utgjorde mall). Hylsorna separatförpackades och autoklaverades sedan före användning.



Figur 1. Bild på hylsan.

Under våren 2008 har sedan får från fem fårbesättningar med hostproblem provtagits. Fyra av dessa besättningar hade tagit kontakt med Svenska Djurhälsovården därför att de hade problem med hosta på sina får. Besättningarna har valts ut med kriteriet att de ska ha ett pågående hostproblem under innevarande stallsäsong. Hur många får som provtogs i varje besättning varierade med besättningsstorlek och bestämdes i samråd med handledarna.

Besättningsinformation

I besättning nr 1 provtogs sex av besättningens sju gotlandsfår den 25 februari 2008. Samtliga djur i besättningen led av hosta. Hostproblemen hade börjat för ca 3 månader sedan, i mitten på december. Tre av gårdens får hade blivit så dåliga att de behövt antibiotikabehandlas. Djurägaren hade köpt en ny bagge i september som kom från en besättning med kända hostproblem. Hostan upplevdes som värre de dagar då väderleken var fuktig, enligt djurägaren. Djurägaren tror att *Mycoplasma ovipneumoniae* konstaterats i baggens ursprungsbesättning.

I besättning nr 2 provtogs 20 av besättningens 77 gutetackor den 26 april 2008. Besättningens får började hosta efter jul och hade nu hostat i cirka fyra månader. Fyra tackor hade dött under ett par veckor och ytterligare två hade antibiotikabehandlats. Djurägarens egen bedömning var att ca 80 % av fåren hade uppvisat hosta. Två av de döda tackorna obducerades och svaret visade på purulent bronkopneumoni. De 20 proverna togs i en grupp där alla hade lammat, för att inte stressa tackorna före lamning.

I besättning nr 3 provtogs 10 av besättningens 15 tackor den 29 april 2008. Hostan bröt akut ut i besättningen i december, under en regnig period. Flera djur började hosta på en gång. Samtliga djur behandlades då med långtidsverkande oxytetracykliner. Hostan minskade men kom tillbaka i full styrka i januari, då hela besättningen penicillinbehandlades. Två tackor dog, varav en obducerades. Obduktionssvaret visade på en akut fibrinopurulent pleuropneumoni med riklig växt av misstänkt pasteurella i renkultur. Hostan minskade efter behandling men ökade igen vid lamningen och efter två till tre veckor började även lammen att hosta. Vid mitt besök i besättningen hostade samtliga djur fortfarande dagligen. Besättningen hade köpt in en ny bagge i oktober 2007.

I besättning nr 4 provtogs 5 slaktfärdiga lamm och 5 tackor. Besättningen består av 200 finull-dorset-tackor och hade haft problem med hosta sedan 2005. Förra säsongen förlöpte dock utan hostproblem. Årets problem började i slutet av mars då lammen började hosta (lammen föddes i januari). Det var bara lammen i besättningen som hostade. Djurägarens bedömning var att cirka 20 % av lammen led av hosta. Fyra lamm hade behandlats med bensylpenicillinprokain och oxytetracyklin. Djurägaren hade inte fått några slaktanmärkningar på de lamm som hostat och redan gått till slakt.

I besättning nr 5 provtogs 10 av besättningens 110 tackor den 9 maj 2008. Fåren hade hostat under nästan hela den installade perioden. Först var det bara de vuxna djuren som hostade men även lammen började hosta när de blivit några veckor gamla. Djurägaren bedömer att det var cirka 60 % av djuren i besättningen som hostade. Ungtackorna och en grupp på 20 nyinköpta tackor hade inte hostat alls. Drabbade djur uppvisade ofta grönt näsflöde och två av djuren hade blivit så dåliga att de hade behövt penicillinbehandlats. Djurägaren upplever att det tog väldigt olika lång tid innan de tillfrisknade, från två veckor upp till två månader

Provtagning i fält

Kliniska symtom

Innan själva provtagningen påbörjades noterades eventuell förekomst av hosta, nedsatt allmäntillstånd, kroppstemperatur över 39,5 grader samt näsflöde. Därefter torkades båda näsborrarna med en ren bomullstuss.

Nässvabb

Nässvabbarna utgjordes av en bakteriologisk provtagningspinne med Amies kolat medium. Provtagningen påbörjades med höger näsborre där en oskyddad provtagningspinne fördes upp så långt det gick i näshålan. Detta oskyddade prov märktes med B. Vid provtagning av vänster näsborre fördes provtagningspinnen först in en skyddande plasthylsa som sedan fördes in så långt det gick i näshålan. Därefter sköts provtagningspinnen ut och sedan in i hylsan igen för att sedan föras skyddad ut ur näshålan, se figur 2 och 3. Detta skyddade prov märktes med A. Proverna förvarades därefter i kylskåp tills de, dagen därpå, anlände till laboratoriet.



Figur 2. Hylsa och provtagningspinne under in- och utförandet i näshålan.



Figur 3. Hylsa och provtagningspinne vid provtagningsögonblicket.

På laboratoriet

Odling

Vid framkomsten till laboratoriet ströks provtagningspinnarna ut på tre olika agarplattor: hästblodagar (blodagarbas med 5 % hästblod), blåagar samt hematinagar (med jästextrakt). Plattorna inkuberades därefter i 37°C under sammanlagt två dygn. Hematinplattorna inkuberades i koldioxidinkubator medan de övriga inkuberades i vanlig inkubator. Avläsning av plattorna skedde två gånger, första gången efter tjugofyra timmar och andra gången efter fyrtioåtta timmar. Om en misstänkt koloni hittades gjordes en avstickning till en ny hästblodagarplatta. Misstänkt bakteriekoloni ströks sedan ut på objektsglas och gramfärgades, samt oxidastestades. Om bakterien var gramnegativ och oxidaspositiv gjordes en pasteurellajäsning (MAS/INS 331). Om bakterien däremot var gramnegativ och oxidasnegativ sattes en API 20E.

Tabell 1. Sammanfattning odlingsschema

Blodagar, blåagar, hematinagar, 37°C i 48h	
Avläses efter 24 och 48 h.	
Misstänkt koloni stryks ut på ny blodagarplatta.	
Gramfärgning och oxidastest	
Om gramnegativ och	
Oxidaspositiv:	Oxidasnegativ:
Pasteurellajäsning	Api 20E

Avläsning av plattorna

Vid avläsning av plattorna noterades om växten var sparsam, måttlig eller riklig, om växten var i renkultur eller blandflora, vilka arter som förekom samt om det fanns någon skillnad mellan prover tagna med hylsa respektive utan hylsa.

RESULTAT

Kliniska symtom

Inget av fåren i studien hade nedsatt allmäntillstånd vid provtagningsstillfället. Samtliga av de provtagna fåren utom fem tackor i besättning nr 4 led av hosta. Frekvensen näsflöde varierade från två till nio får i varje provtagningsomgång, se tabell 2. Störst frekvens sågs hos besättning nummer 5 där nio av tio får hade näsflöde. Näsflödet i denna grupp var även grönare och mer tjockflytande än i de övriga besättningarna. Kroppstemperaturen varierade mycket. Allt från noll till femtio procent av de provtagna fåren uppvisade en kroppstemperatur över 39,5 grader.

Tabell 2. Antal provtagna får som uppvisade följande symtom i de olika besättningarna

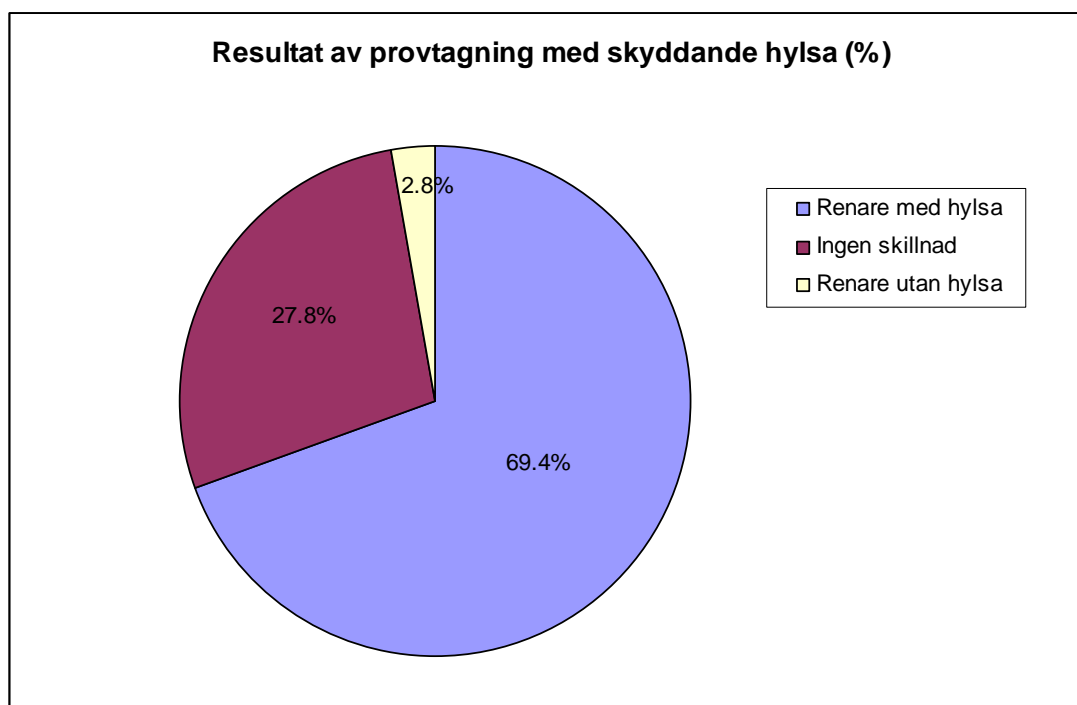
	Besättningsnummer:				
	1	2	3	4	5
Nedsatt AT	0	0	0	0	0
Hosta	6	20	10	5	10
Näsflöde	0	7	6	2	9
Temp över 39,5 °	0	8	0	3	5
Totalt antal provtagna	6	20	10	10	10

Provtagningsresultat

Renare prover med hylsa

Resultatet visade att 69,4 % av proverna uppvisade renare växt på A-plattorna jämfört med B-plattorna, se figur 4. A-plattorna är de som är tagna med en skyddande hylsa

medan B-plattorna är de prover som är tagna utan hylsa. Ett av proverna visade renare växt på B-plattorna. 27,8 % av de tagna proverna uppvisade inte någon skillnad mellan A- och B-plattorna i fråga om renhet.



Figur 4. Den procentuella skillnaden mellan grupperna. Renare med hylsa = A renare än B, Ingen skillnad= A och B är lika, Renare utan hylsa= B renare än A.

Vid avläsning av proverna från de olika besättningarna har olika laboratorieveterinärer varit inblandade. Därför blev avläsningen av besättning nr 2 inte gjord exakt likadant som för övriga besättningar. I den besättningen har bedömningen, renare vs inte renare med hylsa blivit gjord i efterhand utifrån det redan skrivna protokollet, då det inte gjordes vid avläsningen. Av denna orsak har besättning nr 2 tagits bort vid bedömningen av denna parameter i ovan gjorda uträkningar. Hur renhetsfördelningen mellan A och B var på besättningsnivå redovisas i tabell 3.

Tabell 3. Antal prover i varje besättning uppdelat efter bedömning om skillnad med hylsa förelåg eller inte. A= prover med hylsa, B= prover utan hylsa

Besättning	A renare	A och B lika	B renare	Nollväxt
1	1	4	1	0
3	9	1	0	0
4	7	3	0	0
5	8	2	0	0

Bakteriologiska fynd

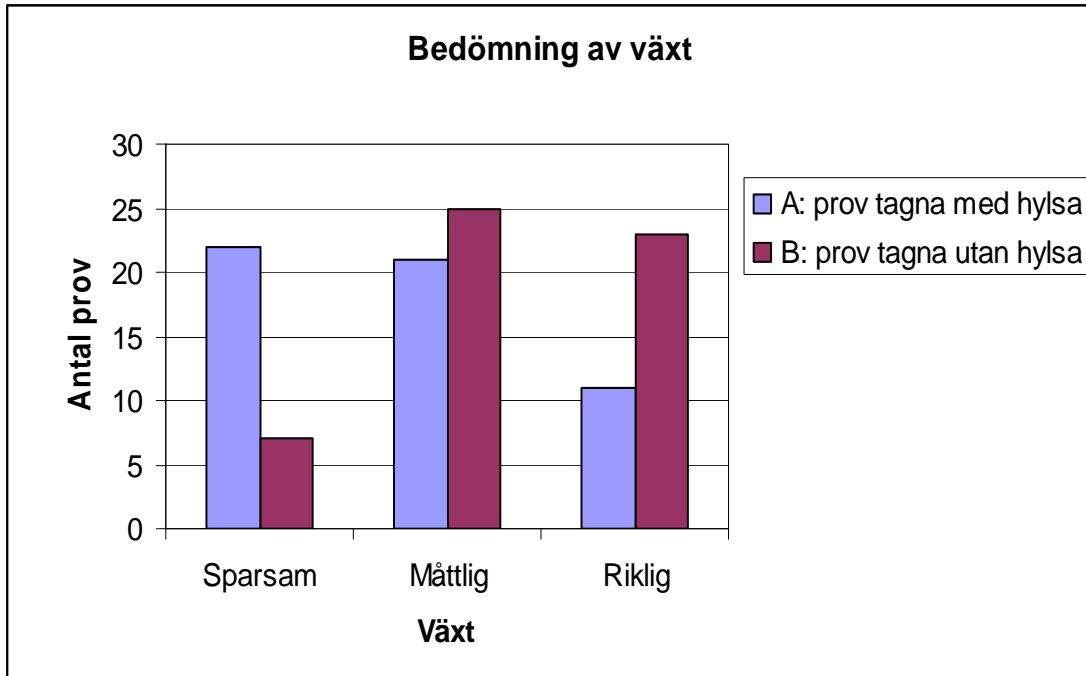
Inget av proverna uppvisade växt i renkultur. På samtliga plattor växte blandflora och de vanligast förekommande kontaminationsbakterierna var stafylokocker och enterokocker, men även streptokocker, *Bacillus*, mikroocker och *Pantoea spp* sågs. Totalt hittades elva isolat av *M. haemolytica*. Fem av dessa isolerades från grupp B, d.v.s. gruppen med provtagning utan hylsa och sex stycken isolerades från gruppen med hylsa, A-gruppen. Fyra av isolaten fanns i besättning nr 5. Ett isolat från varje besättning antibiotikaresistensbestämdes och samtliga var penicillinkänsliga. Andra potentiella patogena bakterier som isolerades var *Klebsiella*, *Pseudomonas* och *Pasteurellaceae*.

I tabell 4 redovisas fördelningen av de olika isolaten av *M. haemolytica*, samt vilken provtagningsgrupp de hittades i. I besättning nr 1 är det samma djur som står för två isolat, samma isolat hittades alltså både med och utan hylsa. Vad gäller övriga isolat har bakterien bara isolerats med endera metoden.

Tabell 4. Antal isolat av *M. haemolytica* i de olika grupperna. A=med hylsa, B=utan hylsa

Besättning	Antal isolat av <i>M. haemolytica</i>		Totalt antal isolat av <i>M. haemolytica</i>
	A	B	
1	1	2	3
2	0	1	1
3	1	0	1
4	1	1	2
5	3	1	4

Vid avläsningen av plattorna registrerades även om växten var sparsam, måttlig eller riklig, se figur 5. Det fanns en tendens att plattor från prov tagna med hylsa oftare hade sparsam till måttlig växt medan plattor tagna utan hylsa oftare uppvisade måttlig till riklig växt.



Figur 5. Skillnad i växt mellan prov tagna med respektive utan hylsa. Den lodräta axeln visar antalet prover i grupperna A respektive B som uppvisade sparsam, måttlig, samt riklig växt på plattan. Antal prover som kunde bedömas efter dessa kriterier var i grupp A 54 stycken och i grupp B 55 stycken. Totalt antal prover som kunde bedömas efter dessa kriterier var 109 stycken.

DISKUSSION

Någon metodik för skyddad provtagning, där provtagningspinnen förhindras att kontamineras av bakterier från yttre delarna av näsborren, existerade inte vid studiens början, varför jag fick tillverka en egen. Orsakerna till att det inte existerade någon skyddad provtagare kan vara många. Dels kan det vara misstron mot att ta nässvabbsprover över huvudtaget (Sheehan *et al.*, 2005) som gör att man inte tar några prover, då det av vissa inte anses ge någon tillförlitlig information. Och dels kan det vara så att fårbesättningarna sällan gör utredningar då dessa ofta är små och därmed har sämre ekonomiska förutsättningar för att kosta på provtagning.

Hylsan som jag utvecklade är mycket enkel i sin konstruktion vilket innebär både fördelar och nackdelar. Fördelarna är att den är billig, enkel att hantera och att det inte tar nämnvärt längre tid att använda den jämfört med att bara ta ett oskyddat prov. Att ta prover med hylsan tolererades väl av fåren och gav i 69 % av fallen ett renare prov. Nackdelarna är att det trots allt är ett extra moment och att den är öppen i toppen, vilket gör att kontaminerande bakterier teoretiskt sett kan komma in under införandet. Det senare verkar dock inte vara något reellt problem.

Vid användning av hylsan vid provtagning kunde man drastiskt minska blandfloraförekomsten, då 69 % av proverna tagna med denna metod uppvisade renare växt på plattan. Den första besättningen uppvisade dock inte lika stor skillnad

som de senare vilket kan indikera att det krävdes viss vana innan man lärt sig att hantera hylsan rätt.

Tanken var att renare växt skulle göra att man lättare kunde urskilja och därmed isolera förekommande patogener. I min studie sågs dock ingen nämnvärd skillnad mellan grupperna i fråga om antal patogena isolat, sex av elva isolat kom från gruppen provtagen med hylsa. Det verkar dock utifrån detta inte vara så att man missar patogener vid användandet av hylsan. En anledning till att man inte såg någon skillnad i frekvens av isolerade patogener kan vara att de flesta av mina provtagna får inte var i den akuta fasen av sjukdomsutbrottet. En annan kan vara att deras hosta berodde på andra orsaker än bakteriella, t.ex. ovan nämnda virus eller *M. ovipneumoniae*, och att de därför bara sporadiskt bar på bakterien och då i mindre koncentrationer.

Totalt sett hittades 11 isolat av *M. haemolytica* på sammanlagt 56 provtagna djur, vilket ger en prevalens på ca 20 % totalt sett. Delar man upp det på besättningsnivå så varierar prevalensen mellan 5 % och 40 %. Detta ligger eventuellt något under normal nivå om man jämför med vad tidigare studier visat angående sjuka fårflockars bärarprevalens (Shreeve, *et al.*, 1972). Orsaken till det kan vara att flera av de i studien provtagna flockarna hade passerat sitt akuta sjukdomsstadium, att provtagningen helt enkelt kom på fel tidpunkt. En annan orsak kan vara att hostan berodde på andra orsaker, t.ex. infektion med *M. ovipneumoniae* eller PIV-3. En del besättningar, framför allt besättning nr 1 hade haft problem så pass länge att hostan kan betecknas som kronisk.

Det är värt att notera att en ansevärd del av isolaten, fyra stycken, isolerades från besättning nr 5, som även uppvisade flest kliniska symtom på akut pågående sjukdom med grönt näsflöde och feber. Denna besättning uppvisade alltså den högsta prevalensen (40 %). Detta pekar i samma riktning som tidigare studier där man sett tecken på att symtom på akut klinisk sjukdom ger fler isolat vid nässvabbsprovtagning (Shreeve *et al.*, 1972).

De kliniska symtomen som allmäntillstånd, feber, näsflöde och hosta uppträder på olika sätt i de olika besättningarna och de har inte heller ett tydligt samband med de bakteriologiska fynden. Som sagt ovan verkar det i besättning 5 vara mest tydlig korrelation mellan symtom på akut klinisk sjukdom och påvisande av flest isolat av *M. haemolytica*. Feber korrelerar dåligt med de övriga parametrarna så som nedsatt allmäntillstånd och näsflöde. Detta är dock ett välkänt problem från andra studier (Sheehan *et al.*, 2005) och temperaturmätning på får är så pass stresskänsligt att det är en svårtolkad parameter. En annan fråga man kan ställa sig är hur lätt det är att bedöma allmäntillståndet på får som trängs ihop och blir stressade. Kanske hade en del av fåren nedsatt allmäntillstånd men att detta var mycket svårt att detektera under de aktuella provtagningsförhållandena.

Samtliga isolat var vid resistensbestämningen känsliga för penicillin. Detta indikerar ett gott resistensläge och är mycket viktig information med tanke på dagens

antibiotikaproblematik. Det goda resistensläget stämmer väl överens med tidigare undersökningar gjorda i Sverige (SVA, 2007).

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ackermann MR, Brogden KA. Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. *Microbes and Infection* 2, 2000, 1079-1088.
- Alley, MR. et al. (1999) Chronic non-progressive pneumonia of sheep in New Zealand - a review of the role of Mycoplasma ovipneumoniae. *N Z Vet J.* 47, 155-160.
- Al-Tarazi, Y.H.M, Dagnall, G.J.R (1997) Nasal carriage of Pasteurella Haemolytica serotypes by sheep and goats in Jordan. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 29, 177-179.
- Ayling, RD., Nicholas, R.A.J. (2007) Mycoplasma respiratory infections. In: Aitken, ID (Ed.) *Diseases of sheep.* 4 ed. 231-235. Oxford (Blackwell Publishing.13)
- Biberstein E. L. et al. (1970) Variation in carrier rates of pasteurella haemolytica in sheep flocks I. *J.Comp. Path.* 80, 499-507.
- Boudewijn, C. (2006) Use of nasal swabs in diagnosis of respiratory disease. *The Veterinary Record* 158, 455-456.
- Brogden, K.A. et al. (1998) Pasteurella haemolytica complicated respiratory infections in sheep and goats. *Vet. Res.* 29. 233-254.
- DeRosa, D.C. et al. (2000) Comparison of Pasteurella spp simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of clinical microbiology* 38, 327-332.
- Donachie, W. (2007) Pasteurellosis. In: Aitken, ID (Ed.) *Diseases of sheep.* 4 ed. 224-231. Oxford (Blackwell Publishing.13)
- Fodor, L. et al. (1999) Serotypes of Pasteurella haemolytica and Pasteurella trehalosi isolated from farm animals in Hungary. *Zentralbl Veterinarmed B.* 46, 241-247
- Haziroglu, R. et al. (1994) Studies of the pathology and microbiology of pneumonic lungs of lambs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101, 441-443.
- Lamontagne, L. et al. (1985) Epizootiological survey of Parainfluenza-3, Reovirus-3, Respiratory syncytial and Infectious bovine rhinotracheitis viral antibodies in sheep and goat flocks in Quebec. *Can J Comp Med* 49, 424-428.
- Malone, FE. (2007) Parasitic bronchitis and pneumonia. In: Aitken, ID (Ed.) *Diseases of sheep.* 4 ed. 236-238. Oxford (Blackwell Publishing.13)
- Mohan, K. et al. (1992) Mycoplasma ovipneumoniae infection in Zimbabwean goats and sheep. *J. comp. Path* 107, 73-79.
- Odugbo, M. O. et al. (2004) The comparative pathogenicity of strains of eight serovars and untypable strains of Mannheimia haemolytica in experimental pneumoniae in sheep. *Vet. Res.* 35, 661-669.
- Poulsen, L. et al. (2006) Occurrence of haemolytic Mannheimia spp. in apparently healthy sheep in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48, 19
- Sharp, JM., Nettleton, PF., (2007) Acute respiratory virus infections. In: Aitken, ID (Ed.) *Diseases of sheep.* 4 ed. 207-211. Oxford (Blackwell Publishing.13)

- Sheehan, M. et al. (2005) New transtracheal bronchoalveolar lavage technique for the diagnosis of respiratory disease in sheep. *The Veterinary Record* 157, 309-313.
- Shreeve, B. J. et al. (1972) Variation in carrier rates of *Pasteurella haemolytica* in sheep II. *J. Comp. Path.* 82, 111-116.
- SVA- Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Hemsida [online](2008-06-09) Tillgänglig: <http://www.sva.se>. [2008-11-22]
- Vatn, S. et al. (2008) Helse og velferd hos sau. 1. ed. Oslo: Tun Forlag AS
- Winter, A., Carnley J. (1999) The sheep keeper's veterinary handbook. Wiltshire. The Crowood press Ltd.