

**Användandet av samlingsprover för att
bestämma besättningsstatus för smitta med
Dictyocaulus viviparus hos förstagångsbetande
nötkreatur**

Malin Åberg

**Handledare: Stefan Alénus
Inst. för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare: Johan Höglund
Inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap**

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	1
INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	3
Bovin lungmask	3
Livscykel.....	3
Epidemiologi.....	4
Diagnostik förr och idag	5
MATERIAL OCH METODER	5
ELISA	5
Försöksmaterial.....	6
Metod	6
RESULTAT	6
DISKUSSION.....	9
ERKÄNNANDEN.....	10

SAMMANFATTNING

Infektion med lungmask – *Dictyocaulus viviparus* – är ett ofta förbiset problem i svenska nötkreatursbesättningar. Infektionen kan samverka med andra luftvägspatogener som till exempel coronavirus och bidra till en sämre hälsa och produktivitet. Försök har visat att diagnos kan ställas antingen genom påvisandet av larver i träck med Baermanns trattmetod eller genom påvisandet av antikroppar med ett ELISA-test. I Norge har sedan länge poolade serumprover använts för att bestämma besättningsstatus för smitta med BVDV. Frågan väcktes om poolade prover även kan användas till att fastställa status för lungmasksmitta i en besättning. Prover från 118 gårdar poolades och undersöktes med ELISA för att jämföras med de individer som ingick i poolerna. Poolerna som var starkt positiva visades innehålla åtminstone ett positivt djur, och de pooler som var strikt negativa innehöll inga positiva djur, vilket tyder på att ett sådant test skulle kunna vara värdefullt för att bestämma smittrycket i en besättning, till exempel inför försäljning. Analys av liknande tester skulle kunna vara värdefulla i epidemiologiska studier om lungmask.

SUMMARY

Infection with the bovine lungworm - *Dictyocaulus viviparus* - is occasionally a problem in Swedish cattle herds. The infection could act in synergism with other infections such as Corona virus to create a poorer welfare and productivity in cattle. Studies have shown that a diagnosis can be made with both the Baermann method and with an ELISA. In Norway diagnosis of BVDV on a herd level is attained through pooled serum samples. The question was raised whether pooled serum samples could be used in a similar fashion to attain status on a herd level for lungworm. Samples from 118 farms were pooled and tested with an ELISA and then compared with the individual samples. Those pooled samples which showed a strongly positive reaction had at least one test positive animal, and the negative pools contained no test positive animals. This indicates that such a test strategy could be useful to determine the risk of infection in a herd, for example preceding a sale. Thus it could also prove to be useful in large scale epidemiologic studies on lungworm.

INLEDNING

Infektion med *Dictyocaulus viviparus* är en av de viktigaste parasitsjukdomarna i tempererade områden i världen. Det är en endemisk sjukdom bland nötkreatur som hålls på permanenta beten. Infektiösa stadier av lungmaskens larver sväljs ner och penetrerar tarmens slemhinna och tar sig vidare till lungorna (Höglund et al, 2004). Lungmask drabbar framför allt förstagångsbetande nötkreatur, som går på tidigare kontaminerat bete eller tillsammans med kroniska tysta smittbärare. Infektionen kan förlöpa utan sjukdomssymptom, men medför alltid en risk för sekundärinfektioner som lunginflammation med hosta och nedsatt aptit samt åtföljande nedsatt tillväxt och mjölkproduktion som följd (Höglund et al, 2001).

En studie av både experimentellt infekterade och icke infekterade kalvar visade att de som inte infekterats med lungmask hade en signifikant högre tillväxt (Höglund et al, 2003). Ett enda utbrott av lungmaskinfektion har i England beräknats kosta djurägaren till en besättning på 100 mjölkkor mellan 3000-3500 euro (Wooley, 1997).

Undersökningar gjorda i Tyskland och Nederländerna visade att prevalensen lungmaskinfekterade gårdar låg på omkring 40 %. I en studie utförd i Sverige framkom liknande siffror (39,4 % i hela landet), med en större andel infekterade besättningar i Mellansverige och i de södra och västra delarna av landet. I denna undersökning som omfattade provtagning av tio förstagångsbetare per besättning ansågs den positiv om minst ett djur av de tio provtagna testades positivt med ELISA. De positiva besättningarna hade ett genomsnitt av $1,2 \pm 2,0$ infekterade djur och spridningen låg på 1-9 positiva djur per besättning (Höglund et al, 2004). Det finns indikationer på att prevalensen djur som är infekterade med lungmask har ökat de senare åren i Sverige (Höglund et al, 2003).

Tidigare har diagnos av lungmaskinfektion baserats på sjukdomstecken, som till exempel hosta, eller påvisandet av larver i träck med Baermanns trattmetod. Nackdelarna med dessa undersökningsstrategier är att infektionen kan cirkulera i en besättning utan att kliniska symptom uppmärksammas och att larverna som detekteras vid Baermann-metoden endast utskiljs under begränsad tid. Under 1980-talet utvecklades en ELISA med vilken antikroppar som utvecklas vid en infektion kan påvisas. Dessa antikroppar ligger kvar över detektionsnivå mellan två till tre månader (Höglund et al, 2004). För att fastställa besättningsstatus för till exempel BVDV har i Norge pooler av serumprover från en specifik grupp djur analyserats med ELISA och därigenom givit ett svar på om infektionen funnits i besättningen eller inte (Lindberg, 1999).

Under 1999 insamlades serumprover från förstagångsbetande nötkreatur från 118 gårdar i Mellansverige. Tre kvigor från var gård provtogs. Dessa prover dokumenterades noggrant och har använts till undersökningar rörande bovina virusinfektioner (Hägglund, 2005). Frågan väcktes om poolade serumprover kan ge ett besättningsstatus avseende lungmask, på samma sätt som för BVDV. Proverna poolades sedermera vid Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU och analyserades med ELISA vid Avdelningen för parasitologi SVA/SLU.

Målet med arbetet var att undersöka hur väl resultat från poolade prover överensstämmer med de individuella prover som ingår i poolen för att härigenom se om det går att upptäcka lungmask i en besättning genom analys av poolade prover.

LITTERATURÖVERSIKT

Bovin lungmask

Dictyocaulus viviparus är en nematod och tillhör familjen Trichostrongylidae. I samma familj återfinns t.ex. *Ostertagia spp* och *Haemonchus spp*.

Nematoder kallas rundmaskar eftersom de i genomskärning är cylindriska. Deras magtarmsystem är tubulärt och munöppningens utseende skiljer sig mycket åt bland de olika familjerna. *Dictyocaulus* har en liten buckal kapsel eftersom de livnär sig på slemhinneprodukter och celldebris.

Livscykel

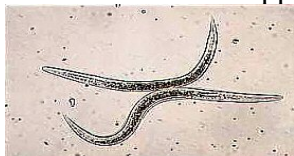
Betesburna nematoder har en snarlik livscykel där de genomgår en serie kläckningar och metamorfoser innan de når det adulta stadiet. De olika livscyklerna kallas L1, L2, L3, L4 och till sist L5, som är den omogna vuxna rundmasken.

Nematoder kan ha en indirekt livscykel vilket innebär att de första två larvstadierna måste kläckas och utvecklas inne i en mellanvärd innan de kan infektera sin slutvärd. Så är till exempel fallet med *Parafilaria* och *Onchocerca*. *Dictyocaulus* har däremot en direkt livscykel och kräver inga mellanvärdar för att kunna genomgå sina utvecklingsstadier (Urquhart et al, 1993).

Direkt livscykel

Den vuxna lungmasken lever och parar sig i trakea och lungornas bronker. Honorna lägger där ägg innehållande fullt utvecklade larver. Äggen kläcks omedelbart och L1-larverna tar sig upp till munhålan, sväljs ner och tar sig sedan hela vägen genom mag-tarmsystemet och ut via träcken. Lungmasken finns alltså som L1 i färsk faeces, till skillnad mot alla andra arter av nematoder vilka utsöndras som ägg.

Larverna innehåller mörka lipidgranulae som utgör en näringsreserv, vilket innebär att de inte behöver föda under sina preparasitiska stadier (figur 1). L1-larven utvecklas snart till L2 och därefter till L3, som förblir innesluten i den kvarblivna kutikulan från L2. Detta skal fungerar som ett skydd och förblir intakt tills det att L3 blir uppäten av sitt värdjur.



Figur 1. Lungmaskens mörka lipidgranulae används som näringsförråd.

Vid optimala betingelser nås L3-stadiet på fem dagar på betet. Den optimala miljö som krävs för att få denna snabba utveckling är bland annat en temperatur på omkring 18-26°C. Vid temperaturer under 10°C kan ingen utveckling av larverna ske och om termometern visar på över 26°C blir larverna hyperaktiva, använder upp all energi som finns lagrade i granulae och dör därmed innan de kan vidareutvecklas.

Även luftfuktigheten är av vikt för larvernans utveckling. Hög luftfuktighet >90 % är optimalt. Man ska ha i åtanke att det i larvens närmiljö i faeces eller nära marken kan vara mycket fuktigare än i luften även vid torrt väder (Urquhart et al, 1993).

När larven väl har nått det inkapslade L3-stadiet är den mycket tålig. Det har konstaterats i flera Europeiska länder att lungmask kan övervintra på betet. Man har i Sverige trott att vi har för svåra förhållanden för att en sådan övervintring ska kunna ske, men resultat har visat att det kan vara möjligt (Höglund et al, 2001).

När L3-larverna inmundigats av ett förstagångsbetande nötkreatur tar de sig ur sitt skal och penetrerar tarmslemhinnan och vandrar via tarmlymfknutorna där de utvecklas till L4. L4 förs sedan vidare via blod- och lymfkärl till lungorna. I detta stadium, den så kallade penetrationsfasen (dag 1-7), ses ännu inga lesioner på lungorna.

Nästa fas är prepatentfasen (dag 8-25), som börjar när larverna bryter igenom till lungornas alveoler. De sprider sig sedan uppåt via bronkiolerna till trakea där man hittar de omogna adulta larverna, L5. Denna migration orsakar en anhopning av inflammatoriska celler, framförallt neutrofiler, eosinofiler och makrofager, som helt ockluderar bronkiolerna och orsakar kollaps av alveolerna. Det är framförallt detta som orsakar de första kliniska symptomen. Kalvar dör ibland akut på grund av den svåra andnöd som kan uppstå.

De flesta djur visar dock främst sjukdomstecken i nästa fas, patentfasen, som varar från dag 26 till 60. I detta stadium har parasiterna samlats i hundratals i bronkerna och tjockt, skummigt slem fyller lumen. Bronkernas epitel är hyperplastiskt och infiltrerat av eosinofiler. Dessutom ses områden av pneumoni orsakad av inhalerade ägg och L1-larver, som orsakar en massiv invasion av t.ex. makrofager i alveolerna. Symptomen som uppvisas varierar från mild, intermittent hosta till svår dyspne.

Den postpatenta fasen (dag 61 – 90) börjar när de vuxna lungmaskarna har stötts bort av kroppen och slutar i de flesta fall med ett tillfrisknande. Bronkerna är fortfarande inflammerade, men efter några veckor har oftast lungvävnaden läkt av igen med fullt återställd funktion. Ibland händer det dock att kraftigt infesterade djur antingen blir sekundärinfekterade med bakterier i sina skadade lungdelar och utvecklar en bakteriell interstitiell pneumoni eller att lungvävnaden i alveolerna blir epiteliserad och oförmögen att utföra ett normalt gasutbyte. I denna grupp av infekterade djur är mortaliteten hög (Urquhart et al, 1993).

Epidemiologi

Det är främst förstagångsbetande djur som drabbas av kliniska symptom av lungmaskinfektion eftersom de inte har utvecklat immunitet. Sjukdomen bryter oftast ut i slutet av betesperioden. I endemiska områden dit norra Europa hör, kvarstår smitta på betena på två sätt. Larverna kan, som nämnts tidigare, övervintra som L3 på betena för att nyinfektera djur som släpps ut på våren. De kan också överleva hos djuren. I smittade besättningar kan man identifiera så

kallade tysta smittbärare, det vill säga djur som bär på smittan utan tydliga symptom. I en studie som utförts på tio besättningar i Mellansverige kunde konstateras att det även bland äldre kor förekom lungmaskinfektion, men att det i denna grupp inte uppvisades sjukdomstecken såsom hosta. Sambete med äldre djur och förstagångsbetare kan vara en väg för smittan att spridas i en besättning (Höglund et al, 2001).

Migrationen av larver från träck ut på bete beror inte enbart på larvernas egna rörelser utan också av en liten träcklevande mögelsvamp, *Pilobulus*. Larverna kryper upp längs svampens fruktkropp och till sporkapseln. När svampen sedan skjuter iväg sina sporer följer larverna med och de kan på detta vis spridas från träckhögar (Urquhart et al, 1993).

Diagnostik förr och idag

För att diagnosticera djur med symptom på lungmaskinfektion kan man använda sig av Baermanns trattmetod, som innebär att man påvisar larver som urskiljs i träck. Denna metod jämfördes med ett ELISA-test (Ceditest[®] ID-DLO, Lelystad, Nederländerna) som påvisar antikroppar mot infektionsämnet i serum. Det visade sig att resultaten av de två undersökningsmetoderna överensstämde väl med varandra. Hos samtliga kalvar kunde emellertid larver hittas i träck ca en vecka tidigare än specifika antikroppar kunde detekteras i serum (Höglund et al, 2001).

I en utförd undersökning där man jämförde specificiteten och sensitiviteten hos olika antikroppsbaseade tester, konkluderades att en indirekt ELISA liknande den som användes i denna studie hade en specificitet och en sensitivitet på båda 97 % (de Leeuw, 1993). Med denna test kan antikroppar påvisas cirka 30 dagar efter infektionstillfället och de kan finnas kvar upp till tio veckor eller mer efter infektionstillfället. Detta bör jämföras med larvurskiljningen som når ett maximum efter sex veckor och därefter snabbt avtar (Höglund et al, 2001; Tenter et al, 1993).

MATERIAL OCH METODER

ELISA

För denna undersökning användes en ELISA från Cedi-Diagnostics B.V. (Ceditest[®] Lungworm). Det är en indirekt ELISA baserad på renade förmodade spermieantigen från adulta *Dictyocaulus viviparus*. Valet av antigen har styrts av att man velat ta fram en test som kan användas i vaccinerade besättningar. Antigenet täcker botten på brunnarna i testplattorna. Om det finns antikroppar i det serum som testas, binder dessa till antigenen efter inkubationen på en timme i 37°C. De bundna bovina antikropparna detekteras sedan med en monoklonal anti-IgGantikropp. Denna IgGantikropp är konjugerad till ett enzym, som skiftar färg när substrat tillsätts. Plattan avläses sedan i en kromograf/absorbansläsare, som mäter den optiska densiteten i varje brunn. Plattans första brunn består av en negativ, en svagt och en starkt positiv kontroll. Individernas optiska densitet jämförs sedan med den optiska densiteten i de starkt positiva brunnarna och uttrycks som ett procenttal av dessa. Provet bedöms som positivt vid ett värde ≥ 15 % (Cedi-Diagnostics B.V.).

$$\text{Värde i procent} = \frac{\text{Korrigerad optisk densitet testserum}}{\text{Korrigerad optisk densitet positiv kontroll}} \times 100$$

Testen har en sensitivitet på 100 % och en specificitet på 99,2 % enligt tillverkaren. Den uppvisar inga korsreaktioner med de andra av nötkreaturens nematoder, och inte heller med leverflundran eller med en opportunist som grisens spolmask, som ibland kan förekomma i lungorna på nötkreatur (Cedi-Diagnostics B.V.).

Försöksmaterial

Materialet bestod av serumprover från 354 individer som insamlats från 118 nötkreatursbesättningar i Mellansverige. I de fall ett djur utgått ur studien innehöll poolerna prov från två individer, annars tre.

22 pooler undersöktes som vid tidigare undersökning visat sig vara positiva,. Tolv pooler valdes ut eftersom de var klart positiva (dvs. ≥ 15 %). Fem pooler i intervallet 10 – 15 % ingick också, liksom fem slumpmässigt utvalda pooler som användes som negativa kontroller. De positiva poolerna märktes 1- 12 och de negativa poolerna n1- n10.

Metod

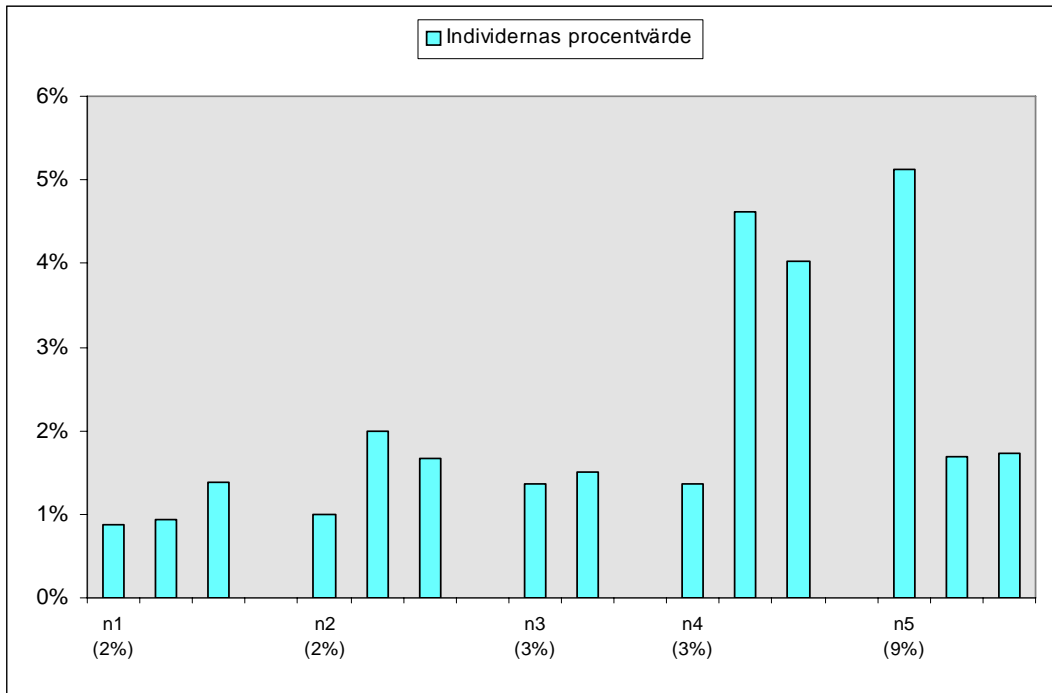
Individproverna från de olika poolerna testades med ELISA'n från Cedi-Diagnostics B.V. och den optiska densiteten jämfördes sedan med värdet för de pooler i vilka de ingick (Figur 2 -5).

Besättningar med ett eller flera positiva djur plottades in på en karta över området för att se hur de låg rent geografiskt i förhållande till varandra.

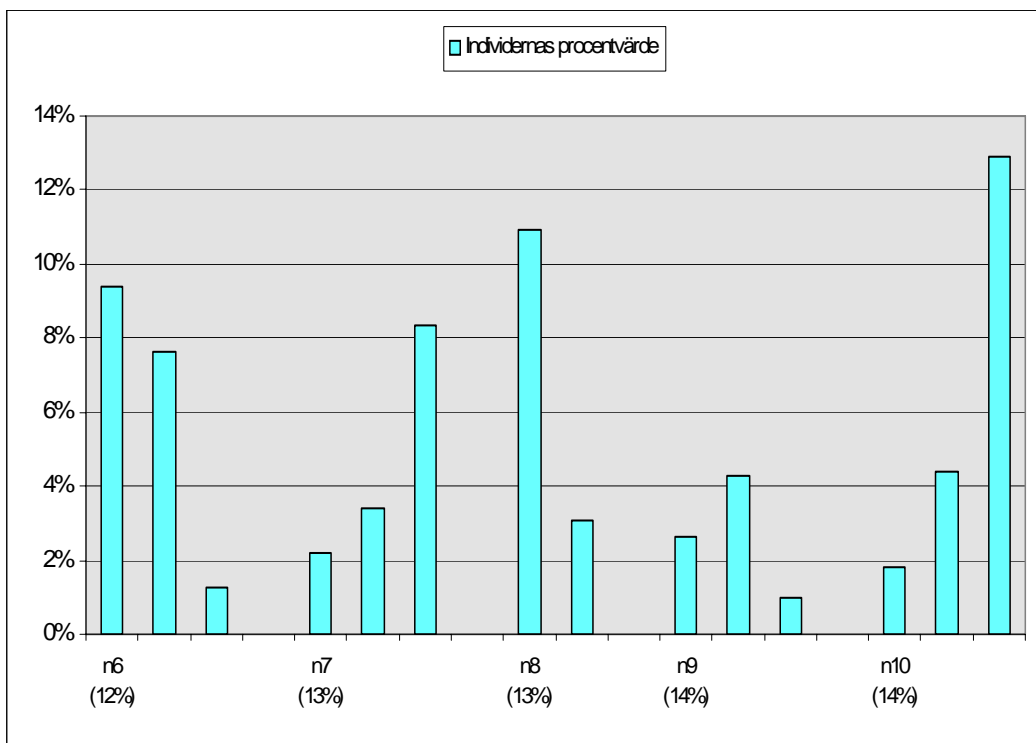
RESULTAT

Poolerna (n1 – n5) med mycket låg optisk densitet visade sig endast innehålla strikt negativa djur. Individernas låga optiska densitet speglades tydligt i poolens låga procenttal. Ingen av individerna i dessa pooler hade ett värde på mer än 6 % och pool n5 hade högst värde med sina 9 % (figur 2).

I poolerna (n6 – n10) med värden som låg precis under gränsen, dvs. ≤ 15 % kunde inga enskilda positiva djur påvisas. De enskilda proverna hade dock högre värden än de i den förra gruppen. Den pool med lägst värde hade ett procenttal på 12 % och de två högsta poolvärdena låg båda på precis under cut-offvärdet dvs. på drygt 14 % (figur 3).



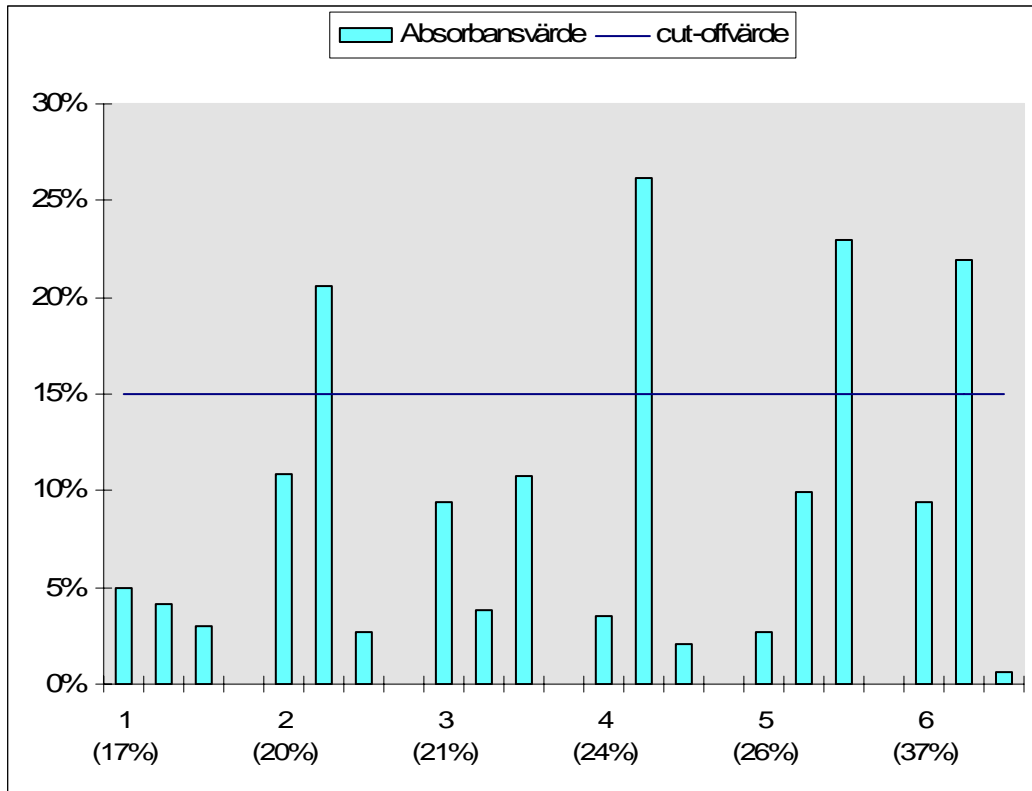
Figur 2. Individvärdena i de negativa poolerna n1 – n6. Poolernas procenttal visas inom parentes.



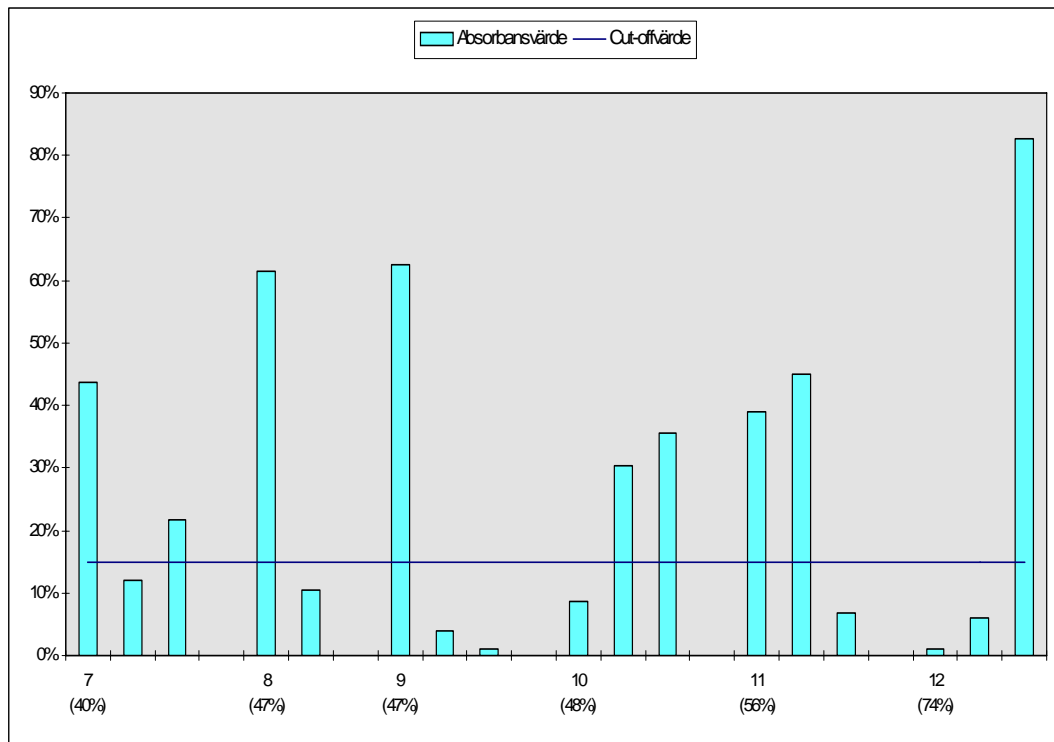
Figur 3. Individvärdena i de negativa poolerna n6 – n10. Poolernas procenttal visas inom parentes.

Bland de pooler som var positiva, visade det sig 10 av 12 pooler innehöll antigen en eller två positiva individer. Dessa individer uppvisade mycket skiftande värden. Den pool (12) som hade högst procentvärde (74 %) hade endast en positiv individ,

men denna individ visade sig ha ett mycket högt procentvärde (84 %), vilket uppenbarligen påverkade poolvärdet starkt. Pool 1 och 3 var svagt positiva, men hade inga enskilda individer med värden över 15 %. Cut-offvärdet är utsatt i diagrammet (figur 4 och 5).



Figur 4. Individvärdena i de positiva poolerna 1 – 6. Poolernas procenttal visas inom parentes. Cut-offvärdet på 15 % visas som en blå linje.



Figur 5. Individvärdena i poolerna 7 – 12. Poolernas procenttal visas inom parentes. Cut-offvärdet på 15 % visas som en blå linje.

De tolv gårdar där positiva djur hittats har prickats in på en karta över Mellansverige för att se hur de låg rent geografiskt i området.

DISKUSSION

Att på ett enkelt vis kunna diagnosticera lungmask i en besättning är naturligtvis av stort intresse för djurägaren då lungmask ger en dokumenterat lägre tillväxt av förstagångsbetande ungdjur. Traditionellt har diagnostik baserats på att påvisa larver i träck, men denna metod har under senare år ersatts av det ELISA-test som utvärderades i denna studie.

Benämningen besättningstest eller besättningsdiagnostik används när mer än ett djur provtas och utvärderas från samma besättning. Provmaterialet kan antingen bestå av flera individuella prover eller av poolade prover. Om provmaterialet består av poolade prover från n antal djur, och om besättningen bedöms positiv, måste det finnas åtminstone ett positivt djur i besättningen. Då kan besättningssensitiviteten (BSe) och besättningspecificiteten (BSp) beräknas enligt följande formel, där P är prevalensen tespositiva djur:

$$BSe = 1 - (1 - P)^n \quad \text{och} \quad BSp = Sp^n,$$

Sp är specificiteten på individnivå. Från denna formel kan ses att om provmaterialet dvs. n ökar, fås en ökad BSe, men BSp minskar. Vidare gör en hög prevalens att BSe ökar men inte BSp (Goyal, 2005).

Denna studie visar att det går att poola prover från flera individer och att sedan analysera dessa som ett samlingsprov, vilket kan bli användbart för att bekräfta lungmaskstatus inför till exempel försäljning av ungdjur.

De pooler som valdes ut på grund av sina låga poolvärden (<6 %) visade sig enbart innehålla individer med mycket låga procenttal (2 % - 9 %). Undersökningen visar att låga poolvärden i en besättning indikerar att det vid tidpunkten för provtagningen inte finns lungmaskinfektion bland djuren. Inte heller de pooler med något högre procentvärde (12 % -14 %) innehöll individer som var positiva. Det går dock inte att utesluta att dessa kan ha varit infekterade tidigare och därefter friats från infektion. Flertalet djur tillfrisknar inom två månader från infektionsstället med eftersläpande höga titrar som följd.

I de pooler med ett positivt värde (17 % -74 %) visade det sig att tio av tolv innehöll positiva djur. De med högst värde hade individer med mycket höga procenttal; det högsta var pool 12 med en individ på 84 %, som uppenbarligen påverkade poolvärdet mycket starkt.

I undersökningen utförd år 2003 (Höglund et al, 2003) sågs en prevalens av infekterade gårdar på 39 %. I denna undersökning blev prevalensen 10 %. Detta resultat kan förklaras med årstidsvariationer, skillnaden i antal djur som ingick i provmaterialet och om det var en kött- eller mjölkproduktionsgård från vilken proverna togs.

På kartan över provtagningsområdet i Mellansverige sågs att gårdarna vars djur var positiva ligger i grupperingar inom området, vilket möjligen indikerar smittspridning mellan gårdarna. Det skulle vara intressant att undersöka vidare huruvida gårdarna har sambete eller hur nära betena ligger varandra.

Syftet med arbetet var att undersöka om man med poolade serumprover från ett antal individer från samma besättning kan bestämma status för lungmask i den besättningen. Resultaten indikerar att man kan använda sig av poolade prover för att fastställa och framför allt att kunna utesluta smitta inför till exempel försäljning av djur. Tekniken skulle också kunna vara användbar i ett eventuellt bekämpningsprogram. Att poola proverna sparar både tid och pengar genom att det går åt av mindre provmaterial på laboratoriet. Fler djur bör således kunna undersökas för samma kostnad.

ERKÄNNANDEN

Ett stort tack till mina handledare Stefan Alénus och Johan Höglund, för deras expertis och till Catarina Svensson som samlat in alla de serumprover som använts. En stor kram och ett stort tack ska Annie Engström på SVA ha för all hjälp och för hennes tålamod med mitt laborerande.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Cedi-Diagnostics B.V. 2005. ELISA for detection of antibodies directed against *Dictyocaulus viviparus* (lungworm) in cattle. Manual.
- De Leeuw, WA. Cornelissen, JB. 1993. Comparison of three enzyme immunoassays for diagnosis of *Dictyocaulus viviparus* infection. *Vet Parasitol* 47, 229-241.
- Gayal, S. Ridpath, J. 2005. *Bovine Viral Diarrhea Virus*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Hägglund, S. Svensson, C. Emanuelson, U. Valarcher, J.F. Alenius, S. 2005. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory complex in Swedish dairy herds. *Vet journal* in print.
- Höglund, J. Christensson, D. Klausson, R. Waller, P. Wilhelmsson, E. Uggla, A. 2001. Spridning av lungmasksmitta i svenska mjölkkoöbäddningar. *Svensk Veterinärtidning* 53, 613-618.
- Höglund, J. Gånheim, C. Alenius, S. 2003. The effect of treatment with eprinomectin on lungworms at early patency on the development of immunity in young cattle. *Vet Parasitol* 114, 205-214.
- Höglund, J. Viring, S. Törnqvist, M. 2004. Seroprevalence of *Dictyocaulus viviparus* in first grazing season calves in Sweden. *Vet Parasitol* 25, 343-352.
- Lindeberg, A. Alenius, S. 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64, 197-122.
- McKeand, J.B. 2000. Vaccine development and diagnostics of *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology* 120, pp17-23.
- Tenter, AM. Bellmer, A. Schneider, T. 1993. Evaluation for *Dictyocaulus viviparus*-specific antibodies in cattle. *Vet parasitol* 47, 301-314.
- Urquhart, G M. Armour, J. Duncan, J L. Dunn, A M. Jennings, F W. 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Wooley, H. 1997. The economic impact of husk in dairy cattle. *Cattle Pract* 5, 315-317.