



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Metoder för parasitundersökning i fårbesättningar

Elin Hammarsten

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:77*

Metoder för parasitundersökning i fårbesättningar

Methods for parasitological examination in sheep herds

Elin Hammarsten

Handledare: Johan Höglund, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Giulio Grandi, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX070830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:77

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: får, parasiter, *Haemonchus contortus*, poolade samlingsprover

Key words: sheep, parasites, *Haemonchus contortus*, composite fecal samples

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Infektioner med mag- och tarmparasiter är ett betydelsefullt veterinärmedicinskt problem i fårbesättningar världen över. För att undvika att avmaska djuren i onödan eller missa djurgrupper i behov av behandling är det viktigt att det finns diagnostik som effektivt fångar upp fårgrupper med ett högt smittryck. Ett vanligt sätt att uppskatta smittläget fårbesättningar är att analysera antalet parasitägg i samlingsprover från träck hos ett visst antal djur i besättningen. Resultatet används sedan för att uppskatta smittrycket i besättningen i stort. Den här studien hade två övergripande syften: huvudsyftet var att undersöka i vilken utsträckning antalet individuella träckprover som ingår i ett samlingsprov påverkar provsvarets precision. Ett ytterligare syfte var att undersöka hur utskiljningen av parasitägg samt parasitartförekomsten fördelade sig mellan individerna i en relativt liten hobbybesättning.

Provmaterial i form av individuella träckprover undersöktes från två olika grupper; varav 60 prover kom från Vidilab (ett laboratorium som rutinmässigt undersöker träck för parasitologisk analys), och 49 prover samlades in från en uppländsk hobbybesättning. I båda fallen analyserades träckproverna med McMasterteknik dels var för sig, dels som samlingsprover från flera individer per grupp. De individprover som ingick i de poolade samlingsproverna sorterades både slumpmässigt och i olika pooler bestående av prover med hög respektive låg äggutskilning. Parasiternas artsammansättning i samlingsproverna undersöktes med hjälp av digital droplet (dd)PCR. Slutligen genomfördes bootstrapanalys med data från de olika provtagningsgrupperna för att teoretiskt ta reda på hur precisionen i de samlade resultaten påverkas av olika individantal som kan ingå i poolade samlingsprover.

Den här studien visade att spridningen mellan individernas äggutskiljning var stor i båda provtagningsgrupperna. En liten andel av djuren utskilde stora mängder parasitägg medan majoriteten av individerna endast utskilde liten mängd eller inga parasitägg alls. I ddPCR-undersökningen påvisades de tre vanligaste endoparasiterna som infekterar svenska får. Undersökningen visade dessutom indirekt att det förekom andra trichostrongylida arter i proverna. Bootstrapanalysen visade att precisionen för provresultatet ökade med antalet ingående individprover, något som även visats i tidigare studier. Sammanfattningsvis stödjer den här studien de fynd som gjorts i tidigare studier. Provresultaten vid undersökning av samlingsprover påverkas av flera faktorer där individantalet som provtas utgör störst roll när man vill öka precisionen

SUMMARY

Infection with endoparasites is a problem in sheep flocks worldwide. In order to avoid treating animals with anthelmintics unnecessarily, or missing animal groups in need of treatment, it is important that there are diagnostic tools that effectively detects sheep groups with a high degree of infection. A common way of estimating the degree of infection in sheep farms is to analyze the number of parasitic eggs in samples from a certain number of animals in the flock. The result is then used to estimate the overall degree of infection in the flock. The purpose of this study was first to investigate the distribution of parasitic eggs between the individuals in a relatively small flock of sheep as well as to investigate what endoparasite species were present in the flock. The third, and most important purpose of the study, was to investigate to what extent the number of individual fecal samples included in a composite sample influences the accuracy of the estimation of the flock mean.

Material in the form of individual fecal samples were examined from two different sample groups; 60 fecal samples came from Vidilab (a laboratory that routinely examines fecal samples for parasitological analysis) and 49 samples were collected from a hobby flock. In both cases, the individual samples were analyzed with the McMaster method independently, as well as in the form of composite samples that were made up of samples from several individuals per group. The individual samples that were included in the composite samples were sorted both randomly and in different pools consisting of samples with high and low egg counts, respectively. The composition of the parasites in the pool samples was examined using digital droplet (dd) PCR. Finally, a Bootstrap analysis was conducted with data from the different sampling groups to theoretically determine how the egg count result is influenced by different individual numbers that can be included in pooled sampling.

This study showed that the range of egg secretion between individual sheep egg was high in both sampling groups. A small proportion of the animals yielded high egg counts while the majority of individuals only excreted small amounts or no parasitic eggs at all. In the ddPCR study, the three most common endoparasites in Swedish sheep herds were detected (*Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.* and *Teladorsagia circumcincta*). In addition, the study indirectly showed that there were other Trichostrongyle species in the samples. The Bootstrap analysis showed that the accuracy of the test result increased with the number of individual samples, as shown in previous studies. In summary, this study supports the findings made in previous studies. The test results for examining pool samples are influenced by several factors where the individual number tested is the most important factor in increasing precision.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Betesburna nematoder i Sverige.....	2
Haemonchus contortus	2
Trichostrongylus spp.	3
Teladorsagia circumcincta.....	3
Nematodirus arter.....	3
Diagnostik och kontrollstrategier	4
Rekommendationer i Sverige	4
Rekommendationer i andra länder	4
Kvantitativa metoder för diagnostik.....	5
Fördelning av epg-värden i populationer	6
Fördelning av ägg i enskilda träckprover	6
Undersökning av samlingsprover.....	7
Individantalets betydelse	7
Samlingsprover respektive individuella träckprover.....	8
Metodens känslighet.....	8
Material och metoder.....	9
Provmaterial	9
Laboratorieanalys	9
Undersökning av artsammansättningen i larvkulturerna.....	11
Bearbetning av data.....	12
Resultat.....	13
Förekomst och fördelning av nematodägg i provmaterialet.....	13
Artsammansättningen.....	14
Undersökning av poolade samlingsprover	15
Överrensstämmelse mellan samlingsprover och individuella prover.....	16
Individantalets betydelse för provsvaret.....	17
Diskussion	19
Tack.....	20
Referenser.....	21

INLEDNING

Infektioner med betesburna maskar utgör ett viktigt veterinärmedicinskt problem för får på bete. Vanliga sjukdomstecken vid kraftig infektion är diarré och/eller anemi vilket i värsta fall kan leda till att dödligheten bland djuren i flocken ökar, framför allt bland dräktiga tackor och bland lamm. Infektioner med mag- och tarmmaskar orsakar dock främst inappetens med minskad tillväxt vilket i sin tur ger ekonomiska bortfall för djurägaren (Sutherland & Scott, 2010). För att kunna övervaka parasitförekomsten och därigenom ta reda på om behandling med avmaskningsmedel bör sättas in, är det viktigt att det finns fungerande diagnostik som effektivt fångar upp betesgrupper med hög parasitbörda. Uppföljande undersökningar efter utförda behandlingar är i regel också viktigt för att se om avmaskningen haft avsedd effekt.

Den mest använda tekniken för påvisning och kvantitativ analys av fårets endoparasiter är med så kallad modifierad McMaster-teknik (Vidilab, 2017; SVA, 2017), där träck används som undersökningsmaterial. Metoden ger en ögonblicksbild över antalet parasitägg som finns i djurens träck och där provsvaret ger information om hur många äggläggande parasitmaskar som fåret är infekterat med (Bowman, 2009). Att analysera träck från alla enskilda individer i en besättning är i regel tidskrävande och innebär även en stor arbetsinsats för de som utför provtagningen och den efterföljande analysen, vilket i sin tur gör att den blir kostsam. För att underlätta detta steg analyserar man därför ofta samlingsprover, där enskilda prover från flera individer poolas till ett och samma prov (SVA, 2017, Gård & Djurhälsan, 2017) Hur många djur i besättningen som bör ingå i en dylik undersökning är enligt litteraturen omstritt (Morgan *et al.*, 2005, Hood *et al.*, 2006). De rekommendationer som ges skiljer sig dessutom åt mellan rådgivande organisationer i olika länder.

Tidigare studier tyder på att risken för att under- eller överskatta äggutskiljningen vid undersökning av samlingsprover i en djurgrupp är beroende av flera faktorer. Bland de faktorer som tycks kunna påverka resultatet mest verkar antalet individer som provtas i djurgruppen ha störst betydelse, under förutsättning att proverna är tagna på ett korrekt sätt. Exempel på andra faktorer som kan påverka provresultatet är hur väl proverna från flera individer blandas och hur många McMaster-räkningar som utförs. Vilka djur som väljs ut för provtagning tycks också spela in (Hood *et al.*, 2006, Morgan *et al.*, 2005)

Målet med den här studien var att kartlägga parasitförekomsten dels i en mindre hobbybesättning, dels i ett antal prover som var inskickade till laboratoriet Vidilab i Enköping. I båda fallen undersöktes proverna dels genom individuell McMasteranalys av träck dels från samtliga individer, dels genom att undersöka poolade prover. Det övergripande syftet med studien var att ta reda i vilken grad antalet träckprover som tas i förhållande till antal djur i besättningen påverkar provsvaret.

LITTERATURÖVERSIKT

Betesburna nematoder i Sverige

Flertalet betesburna endoparasiter som infekterar får är nematoder (rundmaskar) inom överfamiljen Trichostrongyloidea (strongylider). Livscyklerna för de olika arterna som ingår i denna grupp är mer eller mindre identiska och innefattar flera frilevande (L1, L2, L3) och parasitära larvstadier (L4 och L5) som slutligen utvecklas till vuxna (adult) maskar inuti värdjuret. Med undantag för fårets lungmask (*Dictyocaulus filaria*) lägger de adulta maskarna ägg i fårets mag- och tarmkanal, varpå de följer med träcken ut på betet. Äggen kläcks därefter och utvecklas så småningom till infektiösa tredjestadielarver (L3). Den tid det tar att fullborda den externa utvecklingen på betet beror på väderlek och parasitart. Intaget av L3 sker dock alltid när fåret betar. Detta innebär att smittrycket och risken att bli infekterad ökar ju fler smittade äggutskiljande djur man har per betesytenhet (Bowman, 2009)

Fokus i denna studie har lagts på nematoder och i synnerhet arter inom överfamiljen Trichostrongyloidea, bland dessa återfinns bland andra den stora löpmagsmasken *Haemonchus contortus*, olika tarmmaskar *Trichostrongylus* spp. och mellanstor magmask *Teladorsagia circumcincta* (SVA, 2017).

Haemonchus contortus

Detta är en relativt vanlig rundmask i svenska fårbesättningar och påträffas i cirka 38 % av de prover som skickas för parasitologisk undersökning till laboratoriet Vidilab (Ljungström, S., pers. medd., 2017-12-07). Det är en högpato-gen blodsugande parasitmask som framför allt drabbar dräktiga tackor och lamm (Craig, 2009). Vid akut sjukdom ses ibland ödembildning i käftgropen och djuren kan även visa tecken på anemi såsom bleka slemhinnor och letargi (Bowman, 2009). Plötsliga dödsfall till följd av *H. contortus* kan förekomma i synnerhet bland lammen (Bowman, 2009). Vid kronisk sjukdom tappar djuren i hull och utvecklar så småningom en icke-regenerativ anemi, däremot ses sällan diarré även om djuren är kraftigt infekterade (Craig, 2009). Vanligen ses subkliniska infektioner där det enda tecknet på infektion är minskad tillväxt bland lammen (Bowman, 2009). I och med att *H. contortus* kan lägga flera tusen ägg per dag (Roeber *et al.*, 2013) är det extra viktigt att ha koll på äggutskiljningen hos just denna parasit. Smittvägen är fekal-oral och äggen utsöndras med träcken varefter det vid optimala förhållanden tar mellan 5–10 dagar innan L3 utvecklas (Bowman, 2009). L3-larverna intas med betesgräset och utvecklas till L4 i löpmagens slemhinna där de livnär sig på värdjurets blod. Speciellt hos *H. contortus* är att L4-larverna har förmåga att inta ett vilostadium under vintern, så kallad hypobios, vilket innebär att de effektivt undviker värdjurets immunförsvar (Craig, 2009). Under våren i samband med lamningen reaktiveras larverna som utvecklas till vuxna maskar och börjar producera stora mängder ägg, så kallad ”periperturient” eller “spring-rise” (Bowman, 2009, SVA, 2017). Larverna har i vissa fall visat sig kunna övervintra på betet under svenska förhållanden (Troell

et al., 2005), men de anses framför allt övervintra som inhiberade larver inuti fåren (Waller *et al.*, 2004).

Trichostrongylus spp.

Inom släktet *Trichostrongylus* finns tarmmasken *T. colubriformis* och lilla magmasken *T. axei*. *T. colubriformis* är relativt vanlig parasit hos svenska får (SVA, 2017). Den ger i regel endast upphov till subklinisk infektion men kan vid massinfektion orsaka vattnig diarré, i synnerhet hos djur som är nedsatta av annan orsak (Bowman, 2009). *Trichostrongylus axei* är sällsynt i svenska fårbesättningar och dess ägg återfinns endast i cirka 9 % bland de träckprover från får som skickas till Vidilab (Ljungström, S., pers. medd., 2017-12-07). Parasiten är dock mycket patogen för lamm och har till skillnad från de flesta andra nematoder förmågan att kunna infektera även andra djurslag än får, däribland nötkreatur (Craig, 2009). Kliniska symtom associerade med *T. axei* är diarré och tillväxtstörningar, detta på grund av att parasiten orsakar skada i löpmagsslemhinnan (Graig, 2009). Samtliga *Trichostrongylus*-arter anses kunna övervintra på betet under svenska förhållanden (SVA, 2017).

Teladorsagia circumcincta

Den mellanstora magmasken *T. circumcincta* är en av de vanligast förekommande maskarterna i svenska fårbesättningar (SVA, 2017; Waller *et al.*, 2004). Det är framför allt de sena larvstadierna (L4 och L5) som orsakar skada genom att de penetrerar och skadar de saltsyreproducerande parietalcellerna som finns i löpmagens slemhinna (Craig, 2009). Följden av detta är att djuren får svårt att tillgodose sina energibehov varvid de avmagrar, i synnerhet vid saminfektion med andra maskar (Craig, 2009). Kliniska symtom som sammankopplas med ovin teladorsagios är främst lindrig diarré. (Craig, 2009). Även *T. circumcincta* övervintrar på svenska betesmarker (Waller *et al.*, 2004).

Nematodirus arter

Dessa har liksom övriga strongylider en direkt livscykel med en fekal-oral smittväg, men livscykeln skiljer sig något från den hos övriga trichostrongylider (Craig, 2009). Inom släktet *Nematodirus* spp. finns tre olika arter som är aktuella i svenska fårbesättningar (SVA, 2017). Det är dels *N. filicollis* och *N. spathiger* som sällan orsakar klinisk sjukdom medan *N. battus* kan ge upphov till allvarlig säsongsbunden diarré, framför allt hos lammen (Gustafsson, K., pers. medd., 2017-10-10). I Sverige förekommer *N. battus* bara i enstaka besättningar (Ljungström, S., pers. medd., 2017-12-07), Äggen från samtliga *Nematodirus* arter kommer ut på betet med träcken. För att kunna utvecklas och kläckas är de dock beroende av en kortare period med kyligt väder, följt av en period av varmare väderlek. Detta gör att de flesta infektiösa larverna inom släktet *Nematodirus* och särskilt *N. battus* kläcks på våren vilket kan ge upphov till en "våg" av insjuknande hos framför allt lamm i samband med betesläpp (Bowman, 2009). Samtliga *Nematodirus*-arter har en god förmåga att övervintra på betet i svenska besättningar (SVA, 2017).

Diagnostik och kontrollstrategier

Rekommendationer i Sverige

I Sverige är Gård & Djurhälsan den enskilt största veterinära rådgivande organisationen som riktar sig till fårägare (<http://www.gardochdjurhalsan.se/>). Deras samlade rekommendation är i nuläget att träck bör tas från minst sex olika individer ur samma betesgrupp, till exempel innan betesläpp (tackorna) och kring avvänjningen (lammen). Proverna undersöks sedan gruppvis efter pooling av tre individer ur vardera gruppen. Finns det fler än 60 djur i betesgruppen, bör prov tas från minst 10 % av individerna. Finns det fler än 200 individer i gruppen bedöms det tillräckligt att ta prov från 21 individer. De prover som tas rekommenderas vara så färska kan gärna samlas direkt från rektum. Rekommendationen är att i första hand inkludera prover från djur med misstänkt hög smitta som till exempel ungtackor, lamm och framför allt djur som är i sämre kondition än övriga i gruppen (Gård & Djurhälsan, 2017).

I besättningar som är anslutna till Gård & Djurhälsan är träckprovtagningen ett led i den kontrollstrategi som föregår eventuellt beslut om avmaskning. Inför beslutet undersöker man alltså hur stora mängder maskägg som kommer ut med träcken på betet, men även vilka arter som finns representerade (Gård-och Djurhälsan, 2017b). Det finns inget gränsvärde för hur höga värden avseende ägg per gram träck (epg) som anses vara acceptabelt, detta eftersom de arter som finns i provet är minst lika viktigt som hur stora mängder parasiter som fåret är infekterat med. Detta beror på att de olika strongylida arterna som finns är olika patogena. *Chabertia ovina* är ett exempel på en art som så gott som aldrig orsakar någon skada på värdjuret medan *H. contortus* vanligtvis är väldigt patogen. Även anamnestiska uppgifter om besättningen, som exempelvis betesrutiner, djurmateriäl, senaste avmaskningstillfället, tillväxt hos lammen, sjukdomsförekomst med mera faktorer som vanligen tas i beaktande innan beslut om behandling med anthelmintika. (Gustafsson, K., pers. medd., 2017-09)

Rekommendationer i andra länder

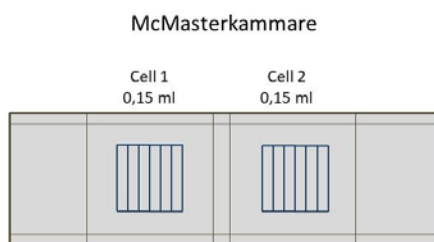
Rekommendationerna gällande det antal individer som bör provtas i en besättning samt hur proverna sedan hanteras på laboratoriet varierar mellan olika organisationer i olika länder. I Norge förordas generellt sett att prover insamlas från mellan fem till tio individer i varje betesgrupp direkt från rektum. I Norge poolas proverna i regel inte på laboratoriet utan de undersöks individuellt (Stuen, S., pers. medd., 2017-09-14). I Danmark finns ingen samlad rekommendation liknande den som utarbetats av Gård-och Djurhälsan i Sverige. Tongivande experter inom området följer dock rekommendationer från den brittiska organisationen Scops (<http://www.scops.org.uk/>) (Thamsborg, S., pers medd., 2017-11-07). Deras rekommendation är att färsk träck samlas in från marken från minst tio individer per betesgrupp. Den rådgivande organisationen för finska fårägare, Lammasmaailma, rekommenderar att prover tas rektalt från mellan 6-9 individer ur varje betesgrupp vid strategiskt utvalda tidpunkter under året (Rautiainen, J., pers. medd., 2017-12-04). I veterinärlaboratorier i Australien undersöks ofta 10–15 prover där proverna antingen analyseras var för sig eller som samlingsprover (Hood *et al.*, 2006).

I detta sammanhang är det dock viktigt att ha i åtanke att produktionsförhållandena kan skilja sig högst avsevärt både inom och framför allt mellan olika länder vilket naturligtvis påverkar de råd som ges till olika typer av producenter.

Kvantitativa metoder för diagnostik

Bland de kvantitativa metoder som rutinmässigt används för träckprovsanalyser är de flesta så kallade flotationsmetoder. Dessa bygger på principen att tunnskaliga strongylida rundmaskäggs flyter (floterar) i vätskor (vanligtvis olika saltlösningar) med högre densitet än maskäggen. De olika flotationsmetoderna har olika detektionsgräns, dels beroende på blandningsförhållandet mellan träcken och flotationsvätskan, dels beroende på räknekammarens volym som skiljer sig mellan respektive metod (se nedan).

Det vanligaste sättet att analysera parasitägg i fårträck i Sverige är genom en så kallad modifierad McMaster-metod (Gård & Djurhälsan 2015; SVA, 2017). Denna används för kvantitativ analys av strongylida nematodägg och bygger på att parasitäggen floterar i en mättad koksaltlösning varpå äggen räknas i en speciell räknekammare bestående av två celler, där varje cell har en volym på 0,15 ml. Provsvaret anges som antalet ägg per gram träck (epg). Enligt grundmetoden blandas 3 g träck med 42 ml vätska, alternativt används andra kombinationer men där man får en spädning på 1:15. Detektionsgränsen är 50 epg vid räkning av två kammare (Ballweber *et al.*, 2014).



Figur 1. En McMasterkammare består av två stycken celler, där varje cell rymmer 0,15 ml vätska.

FLOTAC-metoden är en snarlik italiensk metod utvecklad i Neapel som bygger på samma princip som McMaster-metoden, men som skiljer sig såtillvida att räknekammaren har en samlad större volym (10 ml). Vanligtvis blandas 10 g träck med 90 ml vätska vid undersökning med FLOTAC, vilket ger en spädning på 1:10. FLOTAC-metoden har en minsta detektionsgräns på 1 epg vid räkning av båda cellerna vilket gör att den är känsligare än vanlig McMaster-räkning. En vidareutveckling av Flotac som kallas för Mini-FLOTAC finns numera även på marknaden. När man använder sig av Mini-FLOTAC används 5 g träck till 45 ml vätska vilket ger en spädning på 1:10. Vid undersökning med mini-FLOTAC finns, till skillnad från de tidigare nämnda metoderna, inget steg som kräver centrifugering av provmaterialet. Detektionsgränsen för mini-FLOTAC är 5 epg (Ballweber *et al.*, 2014).

I tillägg till dessa metoder finns det en rad andra undersökningsmetoder (exempelvis FecPac och Wisconsin-metoden) som inte går igenom närmare här. Samtliga bygger dock i likhet med de metoder som beskrivs ovan på att man räknar äggen i träcken efter flotation (Höglund, J., pers medd., 2017-12-05).

Fördelning av epg-värden i populationer

Fördelningen av antalet trichostrongylida ägg som utskiljs med träcken hos olika individer i en djurgrupp har vanligtvis en stor spridning även när djuren vistats på samma bete. Fördelningen av äggen mellan olika individer i betesgruppen kan beskrivas matematiskt och där ett utmärkande drag ofta är att variansen i antalet parasitägg är större än det aritmetiska medelvärdet (Barger, 1985, Sréter *et al.*, 1993). Äggutskiljningen hos gruppen är som tidigare nämnts aggregerad eller klumpad och följer ofta en så kallad negativ binomial fördelning (NBF), vilket innebär att de allra flesta djuren urskiljer små mängder eller inga parasitägg alls medan majoriteten av äggläggande maskar återfinns hos ett litet antal djur i flocken (Sréter *et al.*, 1993, Morgan *et al.*, 2005, Barger 1985). Detta förhållande gäller inte bara för mag- och tarmnematoder hos får utan även bland motsvarande parasiter hos vilda djur och människa (Sréter *et al.*, 1993). Fördelningen i olika betesgrupper är inte absolut utan kan variera högst avsevärt (Morgan *et al.*, 2005).

Enligt NBF beskrivs graden av aggregation genom parametern k vilken minskar ju mer klumpade/aggregerade äggen är hos olika individer. Som antyds ovan varierar k ofta mellan olika betesgrupper (Hood *et al.*, 2006). Värdet för k har dock stor betydelse eftersom man kan iaktta vissa mönster gällande parametern i förhållande till äggutskiljningen hos de individer som ingår i betesgruppen (Morgan *et al.*, 2005).

Fördelning av ägg i enskilda träckprover

I enskilda träckprover är nematodäggen ofta fördelade enligt en diskret sannolikhetsfördelning som kallas Poisson (Burgel *et al.*, 2014). Utmärkande är att variansen är ungefär lika med det aritmetiska medelvärdet.

Förklaring av begrepp

Aritmetiskt medelvärde (\bar{x}): summan av observationerna dividerat med antal observationer.

Standardavvikelse (SD): ett spridningsmått som kan ses som ett medelvärde för de värden som avviker från medelvärdet.

Variansen (s): standardavvikelsen i kvadrat SD^2

Negativ binomial fördelning (NBF): diskret sannolikhetsfördelning som utmärks av att variansen är större än det aritmetiska medelvärdet $s > \bar{x}$.

Poissonfördelning: diskret sannolikhetsfördelning som utmärks av att medelvärdet och variansen är ungefär lika stora $\bar{x} = s$

Den inverterade graden av aggregation (k): en parameter som kan användas inom negativ binomial fördelning för att beräkna hur aggregerad äggutskiljningen är mellan individer i en djurgrupp. Bestäms genom formeln: $k = \bar{x}^2 / (s - \bar{x})$. (Elliott, 1979)

Undersökning av samlingsprover

För att minska tidsåtgången vid McMaster-undersökning av träckprov från en fårgrupp kan man istället för att undersöka individuella prover poola dessa till ett eller flera samlingsprov med träck från flera individer. Fördelen är att detta minskar antalet räkningar även om tidsåtgången för själva provberedningen ökar något. Samtidigt är tanken med att bereda samlingsprover att de ska ge en god bild av den genomsnittliga parasitbördan i flocken. Därigenom blir det möjligt att övervaka äggutskiljningen hos gruppen samt bestämma vilka åtgärder man behöver vidta för vidare parasitbekämpning. Precisionen hos undersökningen är dock beroende av ett antal faktorer. Kortfattat kan man sammanfatta de viktigaste faktorerna som påverkar resultatet vid träckprovstagning och efterföljande analys till: 1) Antalet djur som ingår i samlingsprovet, 2) Hur väl samlingsprovet blandas, och 3) Undersökningsmetodens känslighet (Hood *et al.*, 2006).

Individantalets betydelse

Morgan *et al.* (2005) undersökte hur graden av parasitäggens aggregation i en djurgrupp påverkade provresultatet i besättningar där äggutskiljningen (FEC) är skev och följer den negativa binomiala fördelningen. Enligt författarna ökar risken att man underskattar gruppens äggutskiljning när äggutskiljningen är aggregerad/klumpad, det vill säga när ett fåtal individer har mycket ägg. Det visade sig dock att denna risk minskar när individantalet som ingick i poolen ökade.

I studien undersöktes 606 individuella träckprover ur 14 fårgrupper (Morgan *et al.*, 2005). Det visade sig att i 10 av grupperna var NBF en bra beskrivning för hur äggutskiljningen var fördelad på gruppnivå. Enligt studien varierade k -värdena i de olika grupperna mellan 0,18 och 2,3. Därefter utfördes en analys av hur graden av aggregering påverkar resultaten hos samlingsproverna. Med så kallad Bootstrap-analys av individuella medelvärden visade man att ju mer aggregerad äggutskiljningen är i djurgruppen, desto större är sannolikheten för att man felbedömer gruppens äggutskiljning om ett för litet antal djur undersöks.

I studien konstruerade man äggutskiljningen hos ett antal fiktiva besättningar. Samtliga gruppers medelvärde var 500 epg, men man satte olika k -värden i intervallet 0,001 och 10 i dessa grupper, där höga värden är utmärkande för en låg grad av aggregation. Därefter jämfördes utfallen från de olika fiktiva besättningarna efter analys av samlingsprover från tio slumpvis utvalda individer. Det visade sig att risken för att underskatta äggutskiljningen med ≥ 200 epg var 42 % med ett k -värde på 0,1. Risken för felskattning minskade dock gradvis när k -värdena ökade.

Däremot i grupper där medelvärdet i gruppen istället ligger på 1000 epg var risken för att få ett resultat under 500 epg vid undersökning av 10 slumpvis utvalda individer 10 % när $k = 0,5$. Enligt Morgan *et al.* (2005) var samtliga k -värden testade rimliga och de drog slutsatsen att ett samlingsträckprov från 10 individer är fullt tillräckligt för att få ett tillförlitligt resultat i de allra

flesta besättningar. Det framgår dock inte av studien hur detta påverkas av flockens gruppstorlek.

Samlingsprover respektive individuella träckprover

Hur väl resultaten från samlingsprover överensstämmer med medelvärdet för de individuella prover som ingår i samlingsprovet studerades i en studie av Rinaldi *et al.* (2014). I studien undersöktes träckprover från 10 stycken naturligt infekterade fårbesättningar. I varje besättning togs 20 individuella träckprover som analyserades dels var för sig, dels i pooler bestående av träck från 5, 10 eller 20 slumpvis utvalda individer. Proverna analyserades både med McMaster-metoden och med hjälp av Mini-Flotac. Antalet parasitägg per gram träck från de olika samlingsproverna jämfördes sedan med medelvärden för de individuella data som ingick i samlingsprovet för respektive grupper. Resultaten visade på en höggradig korrelation ($r > 0,94$) mellan epg-värdena för samlingsproverna och för medelvärdet hos de individuella prover som ingick i samlingsproverna.

Metodens känslighet

Eftersom äggen i en delmängd av ett träckprov sannolikt inte är jämnt fördelade kan man anta att precision hos metoden ökar ju fler McMaster-celler som räknas. I förlängningen innebär detta att man vid McMaster-räkning inte kan räkna med att få exakt samma resultat när samma mängd träck ur ett och samma prov undersöks vid flera tillfällen. Att utöka antalet McMaster-räkningar per prov är ett av flera sätt som ökar sensitiviteten i avläsningen. Samtidigt ökar arbetsinsatsen ju fler kammare som fylls och måste undersökas från samma prov. Det finns alltså en avvägning mellan hur stor arbetsinsats man vill lägga i förhållande till precisionen hos provsvaret (Morgan *et al.*, 2005).

I en studie av Hood *et al.* (2006) gjordes en matematisk modell för att kunna beräkna hur mycket känsligheten i avläsningen ökar genom att utöka antalet avläsningar. Enligt författarna var utfallet acceptabelt när äggen räknades i fyra celler, det vill säga i två McMaster-kammare, detta eftersom den procentuella ökningen av tillförlitlighet i resultatet ökade med varje enskild extra räkning. När de individuella träckproverna i flocken hade en hög grad av aggregation sågs relativt sett en minskad vinst av att räkna fler kammare från samlingsproverna. Detta beroende på att variationen i äggutskiljning mellan olika individer bidrog mer till att resultaten varierade, snarare än att spridningen av parasitägg i samma individuella träckprov.

I detta sammanhang är det dock viktigt att komma ihåg att precisionen även påverkas av metodens dynamiska omfång. Det är sannolikt ingen tillfällighet att man valt att lägga sig på en precision av 50 epg när man räknar maskägg i träckprover från får enligt McMastermetodens grundutförande.

MATERIAL OCH METODER

Provmaterial

Provmaterial i form av fårträck samlades in under hösten 2017 på två olika sätt. Den första insamlingen (omgång 1) bestod av 60 stycken individuella träckprover från olika besättningar som hade skickat in individprover för parasitologisk undersökning till Vidilab i Enköping. Provmaterialet kom från tackor, lamm och baggar i olika åldrar och från olika delar av landet, men användes i den efterföljande analysen för att efterlikna en besättning med en hög äggutskiljning. Från varje besättning fanns träck från minst tre stycken individer. Endast prover som vägde över 13 gram ingick i försöket.

Den andra insamlingen (omgång 2) skedde från en minde hobbybesättning belägen i Uppland som bestod av 56 tackor och årslamm. Djuren var mellan fem månader och nio år gamla och av raserna Roslagsfår och Gotlandsfår, samt blandraser i olika kombinationer mellan raserna Suffolk och Texel. Träcken samlades in rektalt, detta för att säkerställa att den var färsk och kom från så många enskilda individer som möjligt. Endast prover som vägde över 10 gram ingick i försöket. Totalt samlades en tillräcklig mängd träck från 49 stycken individer.

Laboratorieanalys

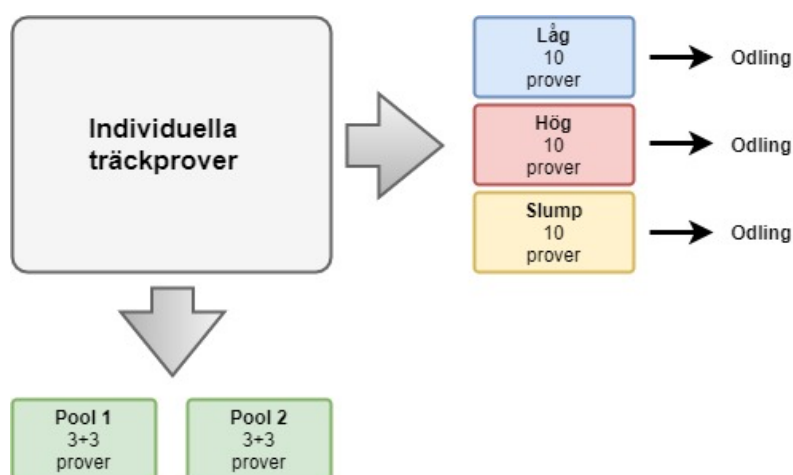
På laboratoriet analyserades de individuella proverna först var för sig med McMaster-teknik enligt följande: $3,0 \pm 0,20$ g träck vägdes upp och blandades med 42 ml vatten, därefter silades proverna och centrifugerades i tre minuter på 1500 rpm. Supernatanten sögs bort med vattensug. Efter att bottensatsen skakats om fylldes röret på nytt med mättad koksaltlösning (densitet 1,20 g/l) som användes som flotationslösning. Proverna blandades därefter väl och fördelades i en McMaster-kammare med två celler. Därefter räknades antalet strongylida parasitägg i båda kamrarna i mikroskop. Antalet ägg som hittats i två kammare multiplicerades med 100 och dividerades med två för att kunna uttryckas som EPG (ägg per gram träck), bakgrunden kring hur detta fungerar ses i rutan nedan:

Känsligheten vid McMasteranalys

Vid McMasteranalys används 3 g träck till 42 ml vatten och spädningen av träcken blir således 1:15. Volymen av en McMasterkammare är 0,15 ml. Varje påvisat ägg i en kammare motsvarar därför 100 ägg per gram träck (epg).

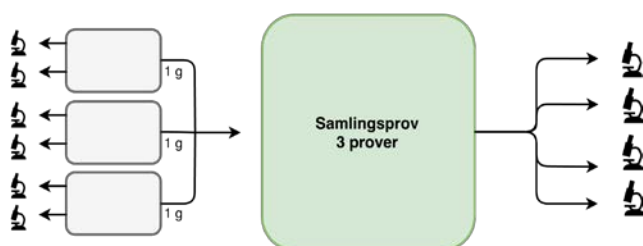
Vid bestämning av antal epg i provet räknas äggen i två kammare multipliceras med 100 och delas med två. (Höglund, 2003)

Efter att de enskilda proverna undersökts individuellt, poolades proverna dels slumpmässigt, dels beroende på provresultat enligt i olika kombinationer med hjälp av Excel. Totalt fem stycken pooler skapades per insamling, se figur 2.



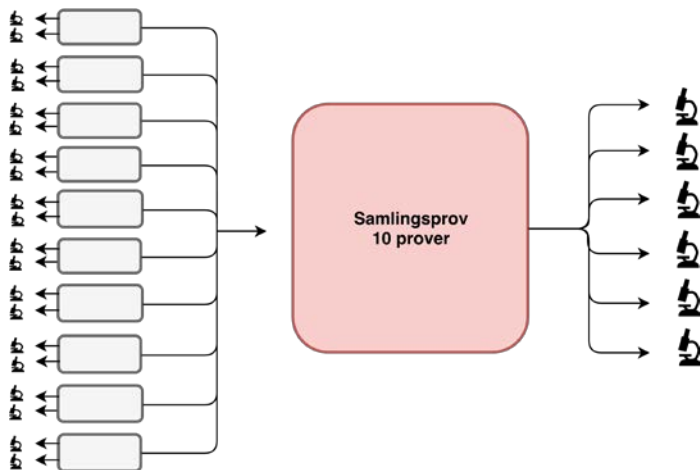
Figur 2. Flödesschema för träckprovsanalyserna.

“Pool 1” och “Pool 2” hade som syfte att efterlikna Gård & Djurhålsans provtagningsrekommendation och bestod av två stycken grupper (replikat) som vardera bestod av två stycken samlingsprover med träck från tre stycken slumpvis utvalda individer i varje grupp. I detta fall vägdes $1,0 \pm 0,10$ g träck upp från varje enskilt prov och förbereddes enligt ovan nämnda metod varefter två stycken McMasterkammare, det vill säga fyra stycken celler lästes av per samlingsprov, se figur 3.



Figur 3. Antal McMasterläsningar per individuellt prov och för ”Pool 1” och ”Pool 2”.

Data från de individuella proverna sorterades i Excel med avseende på stigande epg-värde varefter nya pooler skapades, nämligen: ”Låg” och ”Hög” där de 10 prover med högst respektive lägst epg-värde fick ingå. Även en grupp med slumpmässigt utvalda prover skapades och fick namnet ”Slump”. I ”Låg”, ”Hög och ”Slump” som utgjordes av prover från Vidilab användes $6,0 \pm 0,2$ g träck från varje individ som blandades till tre stycken samlingsprover á 60 g. I proverna från omgång 2 (hobbybesättningen) användes $3,0 \pm 0,1$ g träck vilket gav tre stycken pooler á 30 g. Träcken blandades väl med en spatel i respektive pool varefter 3 g träck förbereddes på samma sätt som de individuella proverna (se ovan). Detta gjordes tre gånger från varje pool. Två stycken McMasterceller per prov fylldes sedan och lästes av med avseende på antalet trichostrongylida ägg.



Figur 4. Antal räknade *Mcmaster*celler per samlingsprov om 10 prover, det vill säga poolerna "Låg", "Hög" och "Slump".

Undersökning av artsammansättningen i larvkulturerna

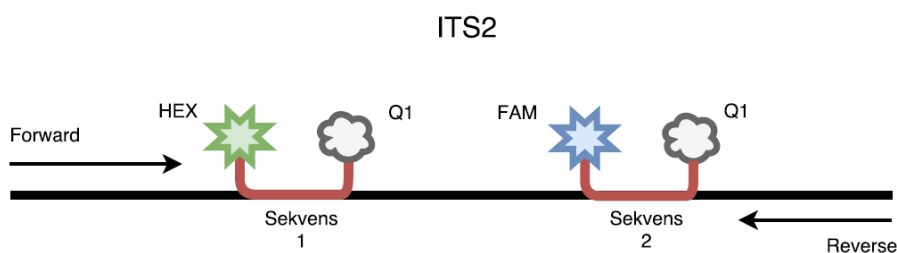
Från "Låg" "Hög" och "Slump" från omgång 1 sattes två stycken larvkulturer vardera och från motsvarande pooler med träck från omgång 2 sattes en larvkultur per pool. Till detta användes 15–25 gram träck per odling. Efter 10–12 dagar i rumstemperatur skördades larverna varefter den procentuella andelen av de tre viktigaste mag- och tarmparasiterna hos får under svenska förhållanden (*H. contortus*, *T. circumcincta* och *Trichostrongylus* spp) undersöktes med hjälp av droplet digital (dd)PCR, en metod som på många vis liknar Realtids-(q)PCR och som översiktligt går till enligt följande:

- 1) Extraktion och rening av DNA/RNA
- 2) Tillverkning av droppar där provet fördelas i upp till cirka 20,000 lika stora droppar med olika kombinationer av primer och prober; en universell plus en för varje art (se ovan).
- 3) PCR-amplifiering genom att provet stoppas i en så kallad "thermal cycler". De sökta målsekvenserna amplifieras och binder till specifika prober som finns tillsatta till en så kallad Master-mix.
- 4) Droppavläsning. Detta sker i ett detektionssystem som har möjlighet att detektera två olika fluorescensfärger (FAM och HEX). Varje droppe som innehåller den sökta DNA-sekvensen kommer orsaka en fluorescerande signal och anges som positiv för målsekvensen. Droppar som inte innehåller den sökta sekvensen avger däremot inget fluorescerande ljus. Dessa droppar anges som "negativa" för den sökta målsekvensen. (Biorad, 2017)

I reaktionen används så kallade "forward" och "reverse" primers och som alltså är specifika för de olika målsekvenserna. Utöver detta används hydroliseringsprober, som har en

fluorescerande molekyl så kallad ”reporter” i ena änden och en så kallad ”quencher” i andra änden. Dessa fungerar kortfattat på så sätt att quenchern ”tystar” fluorescensen som reportern utsöndrar när proben är i intakt läge. Vid amplifiering binder proben in till den sökta sekvensen och reportern klyvs bort från quenchern vilket resulterar i en fluorescerande signal som registreras av en detektor. Eftersom denna reaktion sker i varje droppe är vissa droppar positiva och andra negativa för den sökta sekvensen. På grund av detta är det möjligt att räkna ut en så kallad ”fractional abundance”, det vill säga hur stor andel av hela provet som innehåller den sökta sekvensen (Biorad, 2017).

I just detta fall användes DNA som extraherades ur larvkulturerna från de olika poolerna som provmaterial. En metod utformad av Höglund *et al.* (2017), där totalt fyra stycken kombinationer av primers och prober som var inriktade på detektion av regionen internal transcribed spacer regionen (ITS2). De sekvenser som kvantifierades var dels en nukleotidsekvens som är gemensam hos alla trichostrongylida nematodararter, dels andra unika nukleotidsekvenser som varierar mellan de olika arterna och där de primers och prober som användes var inriktade på nukleotidsekvenser som var specifika för respektive art (antingen *H. contortus*, *T. circumcincta* eller *Trichostrongylus* spp). De reporters som användes kallas för HEX och FAM.



Figur 5. DdPCR. Sekvens 1 motsvarar en sekvens som är identisk hos alla trichostrongylida nematoder. Sekvens 2 varierar mellan arter och i detta fall användes prober och primrar som var specifika för antingen *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* eller *Trichostrongylus*. Q1 representerar quenchrarna och HEX och FAM de reporters som användes.

Bearbetning av data

Databearbetningen av äggräkningarna gjordes i Microsoft Excel 2010. Medelvärde och standardavvikelse med avseende på epg beräknades för de enskilda proverna från provomgång 1 och provomgång 2. De individuella proverna överfördes sedan till ett histogram så att fördelningen av epg skulle tydliggöras i de olika provomgångarna.

För att undersöka sambandet mellan epg-värden från poolade data och medelvärdet för individerna i samlingsprovet användes Pearsons korrelationskoefficient som räknades ut i Excel 2010.

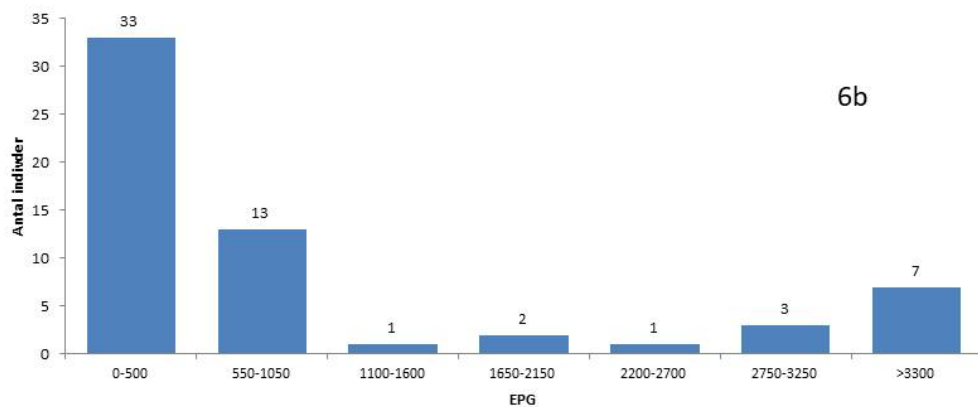
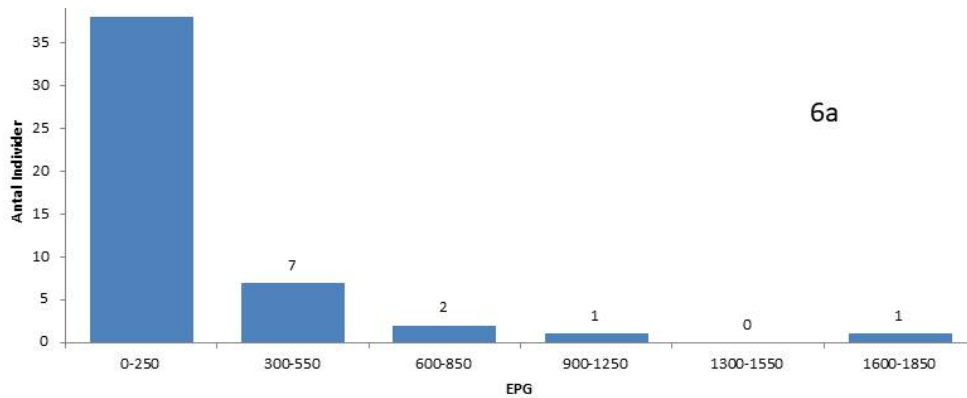
För att undersöka i vilken grad antalet individer som provtas påverkar provsvarets precision när man vill uppskatta smittläget i en besättning i stort användes en slags resamplingmetod som kallas Bootstrap. Detta är en datorbaserad metod som gjordes i statistikprogrammet R 3.4.0. Principen för användandet av denna metod bestod i att epg-värdena från de i individuella träckproverna i de två provomgångarna användes för att skapa fingerade datauppsättningar för varje möjligt antal individer som kan ingå i ett samlingsprov. Ett antal olika samlingsprovstorlekar (det vill säga med olika antal ingående individprover) valdes ut. I detta fall sattes individantalet till $n=1-10$ och $n=15, 20, 25, 30, 35$ och 40 . För varje individantal i ett samlingsprov slumpades därefter 10 000 stycken datauppsättningar med ursprung ur de individuella proverna i de två provomgångarna. Vid utförandet av metoden kunde inga prover återkomma mer än en gång i ett och samma fingerade poolade samlingsprov, detta för att efterlikna en riktig provtagningsituation så väl som möjligt.

För att åskådliggöra sannolikheten att få ett specifikt provsvar vid undersökning av poolade samlingsprover gjordes även ett histogram för resultat vid provtagnings av tre bestämda individantal, (6, 10 och 30 individer) för resamplade data från besättningen. Även denna del gjordes i programmet R 3.4.0.

RESULTAT

Förekomst och fördelning av nematodägg i provmaterialet

Från hobbybesättningen insamlades 49 enskilda träckprover och i proverna från Vidilab ingick totalt 60 individuella prover. Äggurskiljningen varierade stort mellan olika individer och de undersökta provgrupperna (figur 6). Medelantalet nematodägg var signifikant högre i proverna från Vidilab än i besättningsproverna från omgång 2. I hobbybesättningen varierade äggurskiljningen mellan 0 och 1600 epg med ett aritmetiskt medelvärde på 191 epg och en standardavvikelse på ± 305 epg. Äggutskiljningen i proverna från Vidilab varierade mellan 0 – 15800 epg, med ett aritmetiskt medelvärde på 1302 epg och standardavvikelsen ± 2474 epg. Som framgår i figur 6 är båda provsamlingarna skevt fördelade eller klumpade med $k=0,28$ i proverna från Vidilab och $k=0,39$ i hobbybesättningen.



Figur 6. Utskiljning av trichostrongylida ägg i de individuella proverna från besättningen (6a) och i proverna från Vidilab (6b).

Artsammansättningen

De nematoder som ingick i artbestämningen med ddPCR var *H. contortus*, *Trichostrongylus* spp. och *T. circumcincta*, som tillsammans utgjorde mellan 21 och 70 % i de olika larvkulturerna (tabell 1). Som synes i tabell 1 fanns det även andra strongylider i proverna. Detta eftersom alla samlingsproverna innehöll någon art utöver de tre undersökta. Den totala nematodförekomsten bestod alltså av en eller fler arter än de tre som påvisades med ddPCR. I samtliga prover utom ett ("Vidilab hög") var *T. circumcincta* den dominerande arten.

Tabell 1. Artsammansättning i larvkulturerna

Prov	Art			Totalt
	Haemonchus contortus	Teladorsagia circumcincta	Trichostrongylus Spp.	
Besättningen				
"Låg"	0 %	11 %	10 %	21 %
"Hög"	16 %	24 %	23 %	63 %
"Slump"	0 %	57 %	24 %	81 %
Vidilab				
"Låg"	13 %	33 %	24 %	70 %
"Hög"	22 %	6 %	26 %	54 %
"Slump"	7 %	17 %	17 %	41 %

Undersökning av poolade samlingsprover

Resultaten av undersökning av poolade samlingsprover ses i tabell 2 och 3. I totalt tre av beredningarna som bestod av tre prover från besättningen blev resultatet 0 epg

Tabell 2. Resultat från samlingsprover från besättningen

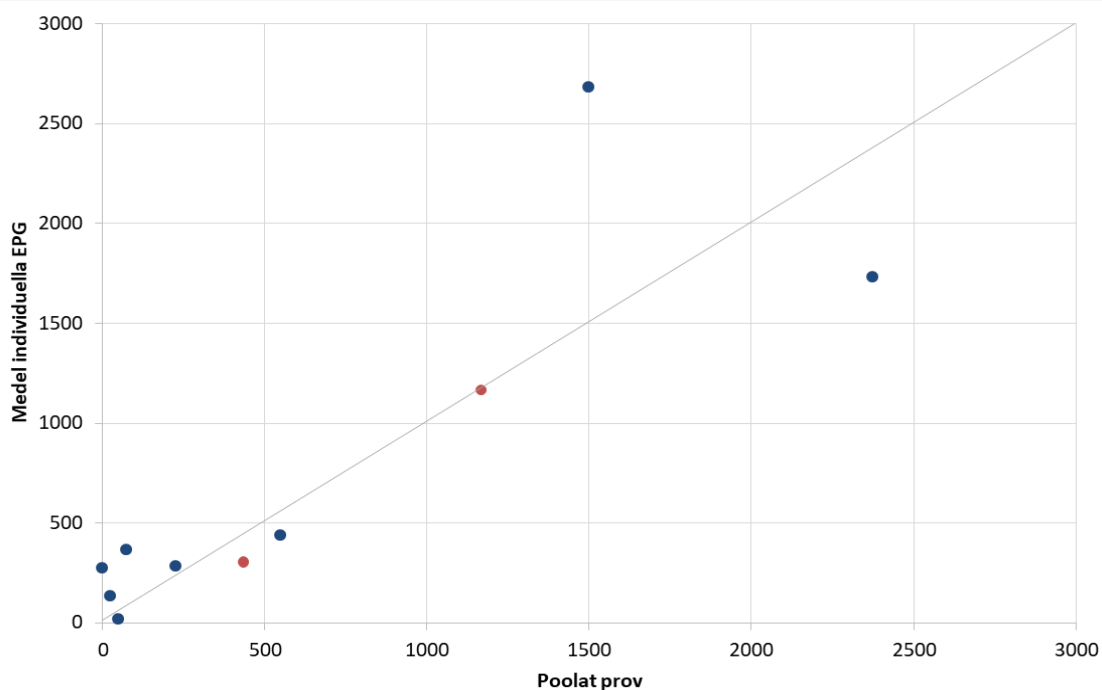
Prov	Medel epg	Antal beredningar	Antal avlästa kammare	Spridning epg
"Pool 1a"	25	2	4	0-50
"Pool 1b"	0	2	4	0-0
"Pool 2a"	50	2	4	0-100
"Pool 2b"	75	2	4	50-100
"Låg"	17	3	6	0-50
"Hög"	434	3	6	400-500
"Slump"	417	3	6	300-500

Tabell 3. Resultat från samlingsproverna från Vidilab

Prov	Medel epg	Antal beredningar	Antal avlästa kammare	Spridning epg
"Pool 1a"	2345	2	4	2300-2450
"Pool 1b"	250	2	4	250-700
"Pool 2a"	550	2	4	400-700
"Pool 2b"	1475	2	4	1350-1650
"Låg"	50	3	6	0-50
"Hög"	5440	3	6	5450-7400
"Slump"	1167	3	6	750-1500

Överrensstämmelse mellan samlingsprover och individuella prover

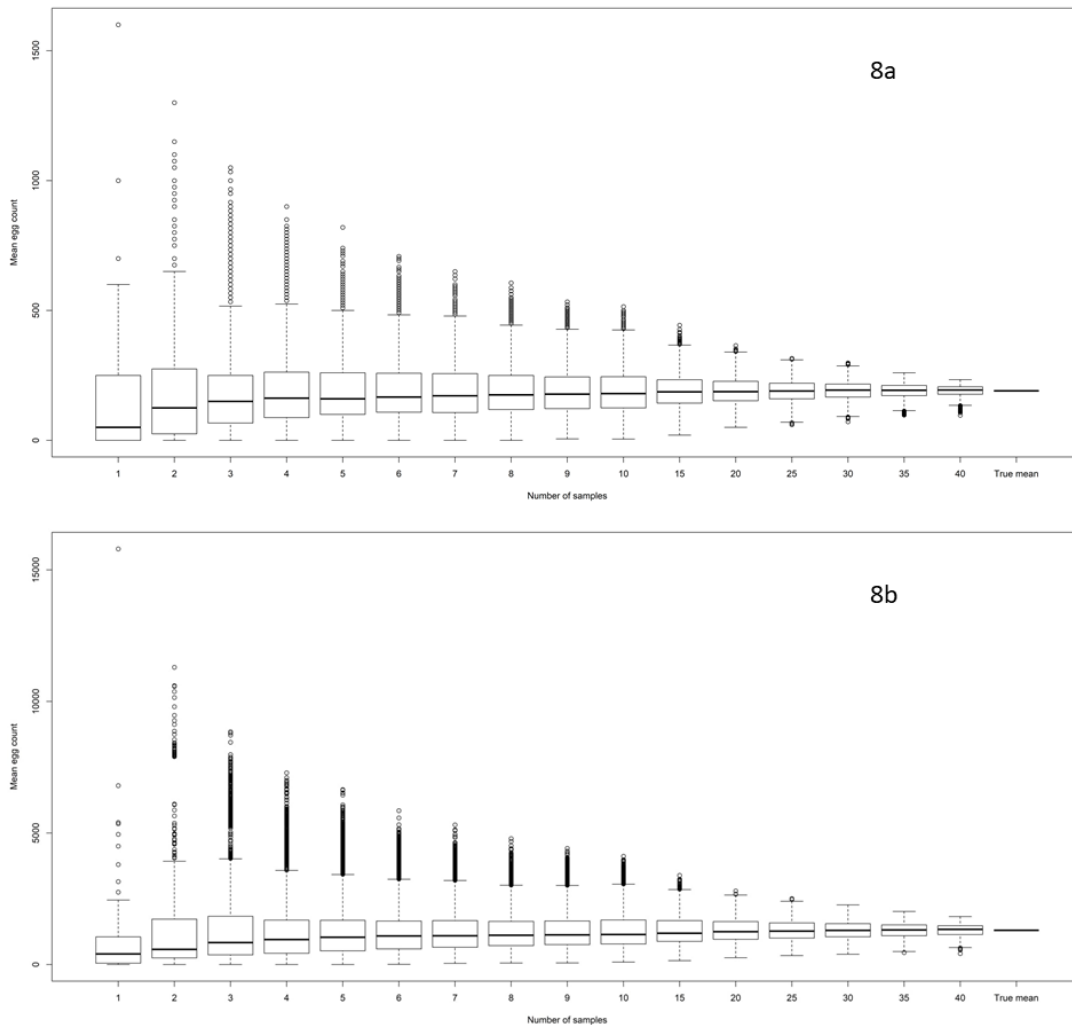
De poolade proverna á 3 och tio individuella prover korrelerade i hög grad med medelvärdet för äggutskiljning i de individuella träckproverna (figur 7), pearsons korrelationskoefficient: 0,849. Samtidigt ses att precisionen minskar ju fler ägg som fanns i provet.



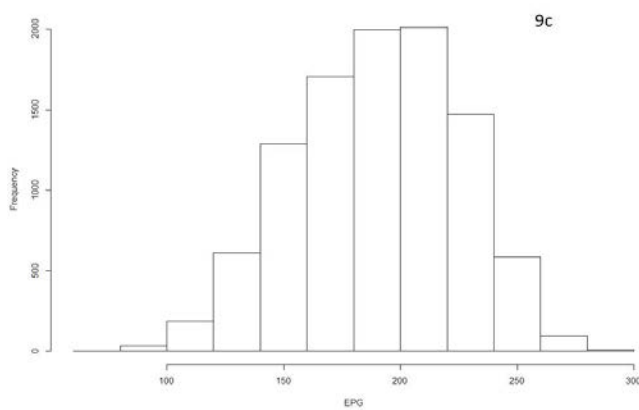
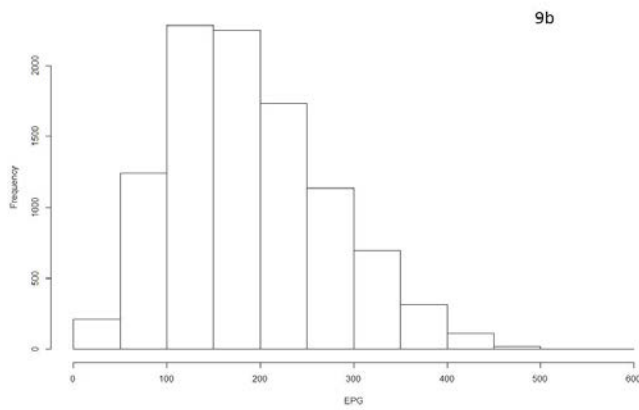
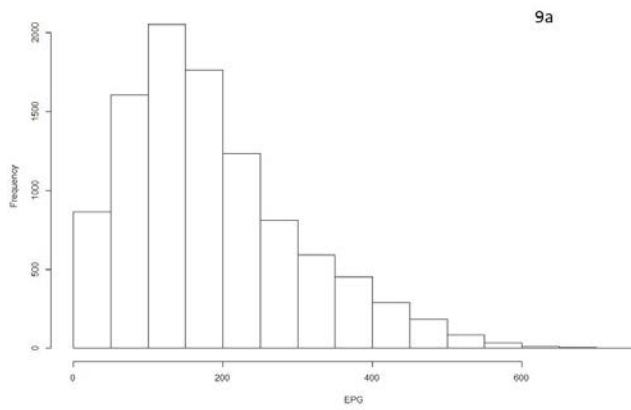
Figur 7. Överrensstämmelse mellan samlingsprover och individuella träckprovsanalyser. Blå punkter representerar pooler om tre stycken slumpade individuella träckprover och röda punkter representerar pooler om 10 stycken slumpvis utvalda träckprover. Grå diagonal linje representerar ekvivalenslinjen ($x=y$).

Individantalets betydelse för provsvaret

Både i provomgång 1 och 2 undersöktes hur antalet individuella prover som ingår i ett samlingsprov påverkar provresultatet. Detta gjordes genom att individdata slumpvis re-samlades från de olika provtagningsomgångarna med Bootstrapping. Analysen upprepades 10 000 gånger med olika individantal för att efterlikna resultaten i samlingsprover (n=1-10 och n=15, 20, 25, 30, 35 och 40). I de fall flera individer valdes ut kunde ingen individ återkomma flera gånger i resultaten från den poolade gruppen (det vill säga undersökningen gjordes utan replacement). Resultatet syns i figur 8a och 8b.



Figur 8. Resampling av individuella träckprover från besättningen (8a) och från Vidilab (8b) till pooler innehållandes olika antal individprover. Horisontella linjer i varje box (låda) i diagrammet visar medianen (tjocka linjen), samt övre och undre kvartilen. Max- och minvärdena (morrhåren) representerar det 95 % konfidensintervallet, det vill säga skattningen av den osäkerhet som togs fram med hjälp av stickprovsdata. Kortfattat kan man säga att sannolikheten är 50 % att man får ett resultat som befinner sig i lådan och att sannolikheten är 95 % att man hamnar inom max-och minvärdena vid undersökning av n antal individer som syns på x-axeln. Som framgår av i figurerna får man alltså en gradvis ökad precision genom att samla fler prover.



Figur 9. Frekvensfördelning av resultat vid undersökning av 6 prover(9a), 10 prover(9b) och 30 individer (9c). Som syns i bilderna blir spridningen mer normalfördelad när man ökar antalet tagna prover.

DISKUSSION

Resultatet i den här studien visade att ett fåtal individer i båda grupperna utskilde stora mängder ägg, medan majoriteten av individerna uppvisade låga epg-värden. Spridningen i äggutskiljning mellan olika individer i de undersökta grupperna var alltså relativt stor. Detta avspeglas i k-värdena som var 0,28 (Vidilab) respektive 0,39 (Besättningen), vilket talar för att äggutskiljningen var aggregerad i båda grupperna. Detta stämmer väl överens med observationer som gjorts i andra studier av andra författare.

DdPCR-analysen visade på förekomst av *H. contortus* både i besättningen och i proverna från Vidilab. Trots att det bevisligen förekom *H. contortus* i hobbybesättningen syntes detta bara i poolen ”Hög” och inte i de andra poolerna. Denna ytterst patogena parasit detekterades alltså bara vid undersökning i ett av de tre samlingsproverna, detta trots att det bevisligen fanns förekomst av den i besättningen. Detta understryker vikten av att prover samlas in från rätt djur när man undersöker ett delantal av djuren i den totala besättningen. Den totala procentuella förekomsten av de tre undersökta arterna var aldrig högre än 81 % vilket visar att det fanns fler trichostrongylida nematodararter i proverna än de arter som ingår i ddPCR analysen. Detta var tydligast i poolen från besättningen som bestod av prover med låga epg-värden, där endast 21 % av nematodarterna utgjordes av någon av de tre undersökta arterna. Vilken eller vilka övriga arter det är frågan om kräver dock ytterligare undersökning.

Resultaten från samlingsproverna bestående av 3 eller 10 prover visade på en stark korrelation med medelvärdena för de ingående individuella proverna ($r=0,85$). Detta visar på att samlingsproverna speglar de enskilda proverna väl. De korrelationer som vi såg i denna studie var dock inte lika starka som i den av Rinaldi *et al.* (2014) där samlingsprover från 5 eller 10 och individprover analyserades. En viktig skillnad mellan denna studie och den som utfördes av Rinaldi *et al.* (2014) är att den senare innehöll prover både från 5, 10 och 15 prover. I min studie undersöktes endast åtta samlingsprover som bestod av tre individuella prover och endast två stycken prover som innehöll 10 prover, något som möjligtvis kan förklara varför en lägre korrelation uppmättes i denna studie.

Den här studien stödjer tidigare resultat som visats av Hood *et al.* (2006) och Morgan *et al.* (2005), nämligen att precisionen i det antal maskägg som hittas vid undersökning av poolade samlingsprover ökar med det antal individer som provtas. Detta gällde både för proverna från besättningen och de som analyserades från Vidilab. Risken för att få ett missvisande resultat av äggutskiljningen i flocken, som representeras av så kallade ”outliers” i bootstrapdiagrammet, minskar mest vid ökning av individantal när dessa är relativt få ($n=1-9$).

Enligt resultaten från hobbybesättningen minskar risken för att få ett resultat på 1000 epg (en överskattning av 810 epg från medelvärdet i gruppen) när individantalet som provtas är fler än fyra individer. Vid undersökning av sex träckprover i besättningen hade det i just detta fall funnits en risk på ca 25 % att få ett resultat på under 100 epg. Vid undersökning av 10 individer

hade risken att få ett resultat på mindre än 100 epg varit ca 15 %. Detta syns även i resultaten från de McMasterundersökningar som utfördes med poolad träck från tre djur, vilken ju är i enlighet med Gård och Djurhälsans rekommendation.

En svaghet i den här studien är att det provmaterial som kom från Vidilab inte kom från en specifik besättning. Detta innebär i förlängningen att proverna eventuellt inte kan användas fullt ut som modell för hur äggutskiljningen ser ut på besättningsnivå. En annan svaghet vad gäller provmaterialet är att totalt sju individer i hobbybesättningen inte provtogs då de antingen smet ur hanteringsfållan eller hade för lite träck i ampullen för att den skulle kunna räcka till efterföljande analyser.

I framtiden vore det intressant att undersöka minst 40 individer i fler besättningar med olika stor äggutskiljning på flocknivå. Det vore även intressant att undersöka hur ett riktat provtagningsprotokoll skulle kunna påverka provresultatet. Ett exempel på vad som skulle kunna ingå i ett sådant är att man skulle kunna undersöka ett visst antal individer ur varje ålderskategori och se hur det påverkar utfallet jämfört med ett slumpmässigt urval av individer för träckprovstagning.

Enligt tidigare studier påverkas precisionen vid undersökning av poolade träckprover av flera faktorer (Hood *et al.* 2006; Morgan *et al.* 2005). Den faktor som tycks påverka resultatet i störst omfattning är antalet individprover som ingår i samlingsproverna. Andra faktorer som kan påverka det hela är hur väl träcken blandas, valet av analysmetod samt hur många undersökningar som görs av samma samlingsprov. I den här studien undersöktes dessvärre inte påverkan av antalet räknade celler i McMaster-kammaren.

Sammanfattningsvis understryker denna studie att samlingsprover i de allra flesta situationer kan ersätta undersökning av träckprover från flera enskilda djur. Det råder samtidigt ingen tvekan om att precisionen hos provresultaten påverkas av flera olika faktorer varav antalet undersökta individer i flocken tycks vara den allra viktigaste faktorn. Olika krav på precisionen hos undersökningsmetoden ställs dock i olika situationer. Om frågeställningen exempelvis är att ta reda på om det finns förekomst av *H. contortus* i besättningen är det extra viktigt provta så många individer som möjligt, detta för att man vill vara säker på att man inte missar en eventuell låggradig smitta i besättningen.

TACK

Jag vill tacka min handledare Johan Höglund som stöttat och hjälpt mig genom arbetets gång. Ett stort tack även till Susanne Gustafsson vars fårbesättning jag har fått provta, samt Vidilab som ställt upp med både inskickade träckprover och labutrustning. Peter Halvarsson har hjälpt mig med Bootstrapanalysen och Safaaa Tawfik har förklarat och hjälpt mig med ddPCR-analysen. Katarina Gustafsson på Gård & Djurhälsan har bidragit input och faktagranskning av det skriftliga arbetet. Grete Wisung har bidragit med stöd och peppning när arbetet känts tungt, tack till dig!

REFERENSER

- Baldock, F., Lyndal-Murphy, M., Pearse, B., (1990). An assessment of a composite sampling method for counting strongyle eggs in sheep faeces. *Australian Veterinary Journal*, 165–167.
- Ballweber, L.R., Beugnet, F., Marchiondo, A.A., Payne, P.A., (2014). American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use - Is there really one best technique? *Veterinary Parasitology, Special Issue: Antiparasitic Drug Use and Resistance in Cattle, Small Ruminants and Equines in the United States - Current Status and Global Perspectives*, 73–80.
- Barger, I.A., (1985). The statistical distribution of trichostrongylid nematodes in grazing lambs. *International Journal for Parasitology* 15, 645–649.
- Bio-rad (2017). *What is Droplet Digital PCR? Applications & Technologies*. <http://www.bio-rad.com/en-se/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology> [2017-10-19]
- Bowman, D. (2009). *Parasitology for Veterinarians*. 9. ed. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Craig, T.M. (2009). Helminth parasites of the ruminant gastrointestinal tract I: Anderson, D.E., Rings, D.M. (red), *Food Animal Practice* (5 ed). W.B. Saunders, 78–91.
- Elliott, J.M. (1977). *Some Methods for the Statistical Analysis of Samples of the Benthic Invertebrates*. (2 ed). Westmorland: Freshwater Biological Association.
- Grenfell, B.T., Shaw, D.J., Dobson, A.P., (1998). Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology*, 117:597–610.
- Höglund, J., (2003). *Laborationskompendium parasitologi*. Institutionen för veterinärmedicinsk mikrobiologi, avdelningen för parasitologi.
- Höglund, J., Skarin, M., Ljungström, B., Gustafsson, K.,(2017). Detection and absolute quantification of major gastrointestinal nematodes of sheep by ddPCR. *Proceedings of the 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, WAAVP 2017, Kuala Lumpur.
- Hood, G., Besier, B., Van Burgel, A., (2006). Sample sizes for quantitative tests with composite samples: an example using the egg count test (Proceeding), Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics.
- Gård-och Djurhälsan (2015). Information från träckprover. Tillgänglig: <http://www.gardochdjurhalsan.se/sv/far/kunskapsbank/artiklar/2012/e/79/information-fran-trackprover/>[2017-11-13]
- Gård & Djurhälsan, Gustafsson, K., Engström, F.,(2017). Håll koll på masken, 1. Ta träckprov på rätt sätt. [Broschyr][2017-12-18]
- Morgan, E.R., Cavill, L., Curry, G.E., Wood, R.M., Mitchell, E.S.E., (2005). Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*, 131;79–87.
- Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G., Vercruysse, J., (2014). Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. *Veterinary Parasitology*, 205;216–223.
- Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B., 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, 6, 153.

- Sréter, T., Molnár, V., Kassai, T., (1994). The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. *International Journal of Parasitology*, 24; 103–108.
- SCOPS (2012). Using Faecal Egg Count (FEC) Monitoring
<http://www.thespringrise.co.uk/faecal-egg-count/> [2018-12-16]
- Sutherland, I., Scott, I., 2010. Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: Biology and Control. Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 242 pp.
- SVA (2017-03-29). Parasitsjukdomar hos får. <http://www.sva.se/djurhalsa/far/endemiska-sjukdomar-hos-far/parasitsjukdomar-far?lid=33879> [2017-12-18]
- Troell, K., Waller, P., Höglund, J., (2005). The development and overwintering survival of free-living larvae of *Haemonchus contortus* in Sweden. *Journal of Helminthology*, 79: 373–379.
- Waller, P.J., Rudby-Martin, L., Ljungström, B.L., Rydzik, A., 2004. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Veterinary Parasitology*, 122:207–220.