



Är mjölkprover en alternativ provtagningsmetod för diagnostik av lentivirus hos små idisslare?

Elin Fogelberg

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2023



Är mjölkprover en alternativ provtagningsmetod för diagnostik av lentivirus hos små idisslare?

Are milk samples an alternative sampling method for the diagnosis of small ruminant lentivirus?

Elin Fogelberg

Handledare:	Jonas Johansson Wensman, Statens veterinärmedicinska anstalt / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Jenny Frössling, Statens veterinärmedicinska anstalt / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa
Bitr. handledare:	Anna Ordell, Statens veterinärmedicinska anstalt / Sveriges lantbruksuniversitet, extern resurs vid Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Ylva Persson, Statens veterinärmedicinska anstalt / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2023
Omslagsbild:	Fotografi taget av Elin Fogelberg.
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	maedi-visna, kaprin artrit encefalit, SRLV, serum, mjölk, pool, frysning, kontrollprogram, ELISA

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Lentivirus hos små idisslare (engelska: small ruminant lentivirus; SRLV) innefattar två olika virus: visna-maedivirus (VMV) och kaprin artrit encefalitvirus (CAEV). Dessa två virus orsakar kroniska infektioner hos små idisslare som slutligen leder till döden. I dagsläget finns varken behandling eller vaccin för att skydda djuren, utan i stället finns kontrollprogram i ett flertal länder för att motverka att sjukdomen etablerar sig i får- och getpopulationen. I Sverige bygger kontrollprogrammet på insamling av individuella serumprover. Syftet med denna studie var att undersöka om mjölkprover kan fungera som ett alternativt provtagningsmedium i kontrollprogrammet. I studien undersöktes även om antikropps nivåer i mjölk varierar beroende på laktationsstadium, om pooler av mjölkprover kan användas i analysen och om frysning påverkar den serologiska analysen av mjölkprover, samt jämförelsen mellan två olika ELISA-kit på mjölk.

I studien deltog 117 får och 17 getter provtagna för mjölk och serum och 54 får endast provtagna för serum. Samtliga prover analyserades med ID Screen ELISA. Gård & Djurhälsan startade ett projekt där fårbesättningar som inte var anslutna till kontrollprogrammet fick skicka in mjölkprover för att utvärdera möjligheten att analysera antikroppar mot VMV i mjölk. Mjölksprovpositiva får från Gård & Djurhälsans projekt testades på nytt senare i laktationen. Tre positiva getmjölkprover poolades också i olika spädningsserier för att undersöka detektionsgränsen för SRLV-antikroppar. I studien analyserades 88 getmjölkprover från ett tidigare examensarbete med samma metod (Elitest ELISA) för att undersöka hur frysning påverkar analysen av mjölkproverna. Samma prover analyserades sedan med ID Screen som en jämförelse mellan ID Screen och Elitest.

Då ID Screen användes som analysmetod erhöll de parade serum- och mjölkproverna från fåren och getterna en god överensstämmelse. Detta resulterade i en sensitivitet på 93,3 % och en specificitet på 100 % för getmjölk jämfört med serum. Samtliga av fåren var negativa för VMV-antikroppar vid den andra provtagningen och erhöll en specificitet på 100 %. Detta tyder på att mjölk kan vara ett lämpligt provtagningsmedium i kontrollprogrammet men att det krävs fler studier där VMV-positiva får och fler getter inkluderas. Huruvida antikropps-nivån varierade i mjölkprover hos får utifrån laktationsstadium gick inte att besvara då samtliga prover var negativa vid den andra provtagningen. Resultatet pekar mot att det kan vara en fördel att följa upp positiva mjölkprover som erhållits tidigt i laktationen med en provtagning senare i laktationen för att undvika falskt positiva provsvar. Poolning av mjölkprover kan eventuellt bli aktuellt i framtiden då ett getmjölkprov kunde spädas så mycket som 1:128. Det behövs dock fler studier för att se hur detta skulle kunna utnyttjas praktiskt. Ytterligare slutsatser som kunde dras var att fyra års frysning av mjölkprover påverkade den serologiska analysen då Elitest användes, då färre positiva prov upptäcktes av Elitest 2022 jämfört med 2018. ID Screen lyckades detektera alla tidigare positiva mjölkprover och anses därmed vara en bättre analysmetod än Elitest.

Nyckelord: maedi-visna, kaprin artrit encefalit, SRLV, serum, mjölk, pool, frysning, kontrollprogram, ELISA

Abstract

Small ruminant lentiviruses (SRLV) include two different viruses: visna-maedi virus (VMV) and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). These two viruses cause chronic infections in small ruminants that ultimately lead to death. Currently, there are no treatments nor vaccines available to protect the animals. Several countries have implemented control programs to prevent the disease from establishing itself in the sheep and goat population. The control program in Sweden is based on individual serum samples. The purpose of this study was to investigate whether milk samples can serve as an alternative sampling medium in the control program. The study also investigated whether antibody levels in milk vary depending on the lactation stage of the animal, whether pools of milk samples can be used in the analysis, whether freezing affects the serological analysis of milk samples, and the comparison between two different ELISA kits on milk.

Serum and individual milk samples were collected from 117 sheep and 17 goats, and 54 sheep were sampled for serum only. The samples were analyzed with ID Screen ELISA. Gård & Djurhålsan started a project where sheep herds, that were not a part of the control program, had the opportunity to send in milk samples to evaluate the possibility of analyzing antibodies to VMV in milk. Milk test-positive sheep from Gård & Djurhålsan's project were retested later in the lactation period. Three positive goat milk samples were also pooled in different dilution series to investigate the detection limit of SRLV- antibodies. In the study, 88 goat milk samples from a previous master thesis were also reanalyzed using the same method (Elitest ELISA) to investigate how freezing affects the analysis of the milk samples. The same samples were then analyzed with ID Screen to be able to compare ID Screen with Elitest.

When ID Screen was used as the analysis method, the paired serum and milk samples from the sheep and goats had a good overall agreement. This resulted in a sensitivity of 93.3% and a specificity of 100% for goat milk compared to serum. All the sheep were negative for VMV-antibodies at the second sampling, obtaining a specificity of 100%. This suggests that milk may be a suitable sampling medium in the control program but that more studies are required where VMV-positive sheep and more goats are included. Whether the antibody levels varied in milk samples from sheep depending on the lactation stage could not be answered as all samples were negative at the second sampling. However, the result indicates that it may be beneficial that sheep with positive milk samples obtained early in lactation are resampled later in lactation to avoid false positive test results. One of the goat's milk samples could be diluted as much as 1:128 and pooling of milk samples may therefore become relevant in the future. Additional conclusions were that storing milk samples in a frozen state for four years affected the serological analysis when using Elitest, as fewer positive samples were detected with Elitest in 2022 compared to 2018. ID Screen succeeded in detecting all previous positive milk samples and was thus considered to be a better analysis method than Elitest.

Keywords: maedi-visna, caprine arthritis encephalitis, SRLV, serum, milk, pooling, freezing, control, ELISA

Innehållsförteckning

1.	Inledning	9
2.	Litteraturöversikt	11
2.1	Maedi-visna (MV) och kaprin artrit encefalit (CAE).....	11
2.1.1	Lentivirus hos små idisslare (SRLV).....	11
2.1.2	Replikation av retrovirus	12
2.1.3	Patogenes.....	12
2.1.4	Klinisk presentation.....	13
2.1.5	Diagnostik	14
2.1.6	Behandling	15
2.2	Kontrollprogram	15
2.3	Mjölk som provtagningsmedium	16
2.3.1	Hur antikroppar hamnar i mjölken	16
2.3.2	Jämförelse mellan serum och mjölk	17
2.3.3	Hur skiljer det sig i olika laktationsstadium?	17
2.3.4	Poolning av mjölk.....	18
2.4	Antikroppars påverkan av frysning	19
2.5	Jämförelse av Elitest och ID Screen	21
3.	Material och metod	22
3.1	Studiepopulation och provtagning av får och get.....	22
3.2	Provhantering och analys	23
3.2.1	ELISA ID Screen.....	23
3.3	Poolning av getmjölkprover.....	23
3.4	ELISA Elitest	24
3.4.1	Upprepning av analys med ID Screen.....	25
3.5	Statistiska analyser	25
4.	Resultat	26
4.1	Fårens provresultat	26
4.1.1	Fårmjölkprover i olika laktationsstadium.....	28
4.2	Getternas provresultat	31
4.2.1	Poolning av getmjölk.....	33
4.2.2	Frysning av getmjölk.....	34
4.2.3	Jämförelse av ID Screen och Elitest.....	37

5. Diskussion.....	40
5.1 Får: Överensstämmelse mellan mjölk och serum.....	40
5.2 Get: Överensstämmelse mellan mjölk och serum	41
5.3 Fårens mjölkprover i olika laktationsstadium	42
5.4 Poolning getmjölk.....	43
5.5 Frysning av getmjölk	44
5.6 Jämförelse av ID Screen och Elitest getmjölk	45
5.7 Studiedesign	46
5.8 Konklusion.....	46
Referenser.....	47
Populärvetenskaplig sammanfattning	52
Tack	55

1. Inledning

År 1933 importerades 20 karakulfår från Tyskland till Island med syfte att förbättra fårproduktionen i landet. Detta ledde till upptäckten av två sjukdomar som fick namnen maedi (dyspné) och visna (borttynande), vilka resulterade i döden för över 100 000 får på Island de nästföljande åren (MacLachlan & Dubovi 2017). Virus som låg bakom sjukdomen isolerades av Bjorn Sigurdsson 1960 och heter numera visna-maedivirus, VMV, och har sedan dess påvisats i alla fårproducerande länder i världen, med några få undantag (Minguijón *et al.* 2015). Island lyckades bekämpa maedi-visna 1965 genom att slakta ut över 600 000 får (MacLachlan & Dubovi 2017). Ett virus som var mycket likt VMV isolerades 1980 av Crawford och Cork i USA och fick namnet kaprin artrit encefalit-virus, CAEV (Crawford *et al.* 1980). Under samma tid upptäckte även en svensk forskargrupp CAEV (Sundquist 1981). Numera går CAEV och VMV ofta under det gemensamma namnet små idisslars lentivirus eller small ruminant lentivirus (SRLV) på grund av deras fylogenetiska likheter och deras naturliga transmission mellan får och get.

SRLV orsakar kroniska infektioner hos små idisslare och kan affektera lungor, leder, juver och centrala nervsystemet och därmed ge upphov till pneumoni, artrit, mastit och encefalit. Den respiratoriska och neurologiska formen leder till utmärgling och död. Djuren kan inte bilda immunitet mot viruset och det finns ännu ingen behandling eller effektiva vaccin som kan kontrollera sjukdomen. Detta har resulterat i uppkomsten av frivilliga kontrollprogram som har en stor betydelse för att undvika att viruset sprids i populationen (Minguijón *et al.* 2015).

I Sverige finns sedan 1993 ett kontrollprogram för SRLV och som i dagsläget bygger på insamling av individuella serumprover (Andersson *et al.* 2021), vilket kräver att en veterinär tar proverna. Detta är tidskrävande och kostsamt, samt att det kan leda till en stressande situation för djuren (Brinkhof *et al.* 2010). Ett flertal studier har undersökt om mjölkprover kan ersätta serumprover i framtiden och kommit fram till lovande resultat (Motha & Ralston 1994; Mazzei *et al.* 2005; Brinkhof *et al.* 2010; Adjadj *et al.* 2019; Persson *et al.* 2022). Mjölksprover medför lägre kostnader och är en mindre invasiv provtagningsmetod, vilket är fördelaktigt för både djurägarna och djuren. Mjölksprovtagning skulle kunna bidra till att fler får- och getbesättningar går med i MV/CAE-programmet. Idag är endast 45 % av

fårpopulationen och 13 % av getpopulationen i Sverige anslutna (Andersson *et al.* 2021). Under 2021 testade 25 djur från fem olika besättningar positivt för MV/CAE. Målet med kontrollprogrammet är att Sverige till slut ska bli fritt från sjukdom, men för att detta ska bli möjligt behöver kontrollprogrammet effektiveras.

Syftet med denna studie var att utvärdera mjölk som möjligt provtagningsmedium för analys av antikroppar mot SRLV genom att bland annat jämföra individuella mjölk- och serumprover från får respektive getter. Vi undersökte även hur frysning påverkar den serologiska analysen av mjölkprover. Syftet innefattade även att undersöka om antikropps nivåer i mjölk varierar beroende på laktationsstadium samt om pooler av mjölkprover kan användas i analysen. Under studiens gång kom vi också att jämföra två olika ELISA-kit, vilket även kommer att presenteras.

2. Litteraturöversikt

2.1 Maedi-visna (MV) och kaprin artrit encefalit (CAE)

Maedi-visna (MV) hos får och kaprin artrit encefalit (CAE) hos get orsakas av visna-maedi virus (VMV) respektive kaprin artrit encefalit virus (CAEV). Dessa virus är nära besläktade och går ofta under det gemensamma namnet lentivirus hos små idisslare (engelska: small ruminant lentivirus; SRLV). Fylogenetiska analyser konfirmerar att dessa lentivirus kan gå över artgränser, vilket innebär att getter kan infektera får och vice versa. En del stammar av viruset är dock mer artspecifika än andra. SRLV tillhör familjen *Retroviridae*, genus *Lentivirus* och förekommer över hela världen, förutom Island där viruset utrotats samt Nya Zeeland och Australien där fårens sjukdom MV ännu inte rapporterats (Caswell & Williams 2016).

SRLV ger upphov till multisystemiska, progressiva, inflammatoriska lesioner i olika organ, men orsakar inte immunnedsättning som andra lentivirus kan göra. De inflammatoriska lesionerna karaktäriseras av borttynande, dyspné, artrit, mastit och neurologisk dysfunktion (MacLachlan & Dubovi 2017). MV och CAE är anmälningspliktiga sjukdomar i Sverige och ska därmed anmälas till Jordbruksverket av veterinär vid konstaterad smitta (Statens jordbruksverk 2021).

2.1.1 Lentivirus hos små idisslare (SRLV)

SRLV är ett höljebärande virus och dess genom består av en enkelsträngad RNA-sträng. SRLV har olika virala gener, bland annat *gag* som kodar för en gruppsspecifik nukleokapsid och olika matrix-glykoproteiner, *pol* som kodar för omvänt transkriptas samt *env* som kodar för ytglykoproteiner (Caswell & Williams 2016). Antikroppar mot SRLV binder ofta till glykoproteinerna SU och TM på lipidhöljet (MacLachlan & Dubovi 2017), medan antikroppsbaseade diagnostiska tester detekterar antikroppar riktade mot glykoproteinerna i matrix (Caswell & Williams 2016).

2.1.2 Replikation av retrovirus

Replikationen av retrovirus sker genom att dess enkelsträngade RNA görs om till en dubbelsträngad DNA-kopia med hjälp av enzymet omvänt transkriptas (MacLachlan & Dubovi 2017). DNA-kopian kallas för ett provirus och proviruset translokeras till värdcellens cellkärna där det integreras i värdcellens genom med hjälp av enzymet integras. Efter att proviruset är inkorporerat i genomet kan det replikeras och transkriberas av värdcellens egna DNA- och RNA-polymeras och nya viruspartiklar kan därefter infektera nya celler. Proviruset kan även ligga latent i värdcellens genom och aktiveras längre fram i tiden, vilket kan resultera i en lång inkubationstid. Värdcellen dör oftast inte av virusreplikationen.

Retrovirus genomgår ofta mutationer och rekombinationer, och kan förändra värdcellens genetiska sekvenser då de interagerar med värdcellens genom (MacLachlan & Dubovi 2017). Virusets omvända transkriptas saknar den korrekturläsning som finns hos värdcellens DNA-polymeras, vilket medför att det vanligen sker mutationer då virusets RNA ska omvandlas till DNA. Detta bidrar till att viruset får en stor genetisk diversitet hos det infekterade djuret. Enligt de Miguel *et al.* (2021) finns fem genotyper (A-E) och mer än 28 subtyper i dagsläget. Detta implicerar hög genetisk och antigen diversitet hos viruset, vilket försvårar serologisk och molekylär diagnos.

2.1.3 Patogenes

SRLV sprids vertikalt via kolostrum och mjölk, men kan även spridas horisontellt via inhalation av nossekret vid nära kontakt mellan djur (Caswell & Williams 2016). Virusets utsöndras i sperma men risken för infektion följande betäckning eller inseminering anses som liten, det krävs dock fler studier inom det området (Minguijón *et al.* 2015). Transplacental transmission mellan en infekterad moder och avkomma kan ske, men är ovanligt (Cutlip *et al.* 1988). Indirekt smitta via exempelvis redskap kan potentiellt vara en risk för spridning, likaså kan återanvändning av kontaminerade sprutor och kanyler utgöra en risk (Minguijón *et al.* 2015). SRLV infekterar i första hand celler tillhörande cellinjen monocytter/makrofager i blodet och i andra vävnader (MacLachlan & Dubovi 2017), som till exempel lungor, mjölkkörtlar, lymfknutor, mjälte, hjärna och leder (Caswell & Williams 2016). På senare år har det även konfirmerats att viruset kan infektera flertal andra celler, såsom epitelceller i juver, dendritiska celler, endotel (Blacklaws 2012; Minguijón *et al.* 2015), epitelceller i lungorna och myocyter (Minguijón *et al.* 2015).

SRLV har en lång inkubationstid, från några månader till flera år. Inkubationstiden för MV har rapporterats upp till nio år. Värddjuret kan generellt inte bekämpa virusinfektionen och bilda immunitet trots en effektiv humoral och cellulär immun-

respons, eftersom proviruset är integrerat i värdgenomet och därmed kan finnas latent i celler med lång livslängd. Detta medför att ett smittat djur blir persistent infekterat. Det är dock inte alla djur som utvecklar klinisk sjukdom under sin livstid (MacLachlan & Dubovi 2017). Antikroppar som bildas mot SRLV tillhör framför allt gruppen IgG1 och kommer alltid att finnas närvarande i djuret men med en viss titervariation (Blacklaws 2012). Nyfödda som infekteras vid födseln har maternella antikroppar via kolostrum/mjölk i cirka två till tre månader, därefter är de oftast seronegativa fram till att de serokonverterar mellan sex och tolv månaders ålder (Ramírez *et al.* 2013).

2.1.4 Klinisk presentation

Sjukdomssyndromet hos får och get varierar beroende på olika faktorer hos viruset och den infekterade individen. Olika virusstammar eller subtyper kan ha olika snabb replikation. De kan även ha olika virulens, tropism för olika celler och olika tendens att orsaka inflammation i lungor, leder, juver eller nervsystemet. Djurets genetik och ras kan också påverka sjukdomspresentationen (Caswell & Williams 2016). Detta medför att det är svårt att veta vilka kliniska symptom som ett infekterat djur kommer att uppvisa (MacLachlan & Dubovi 2017).

Maedi-visna

Maedi betyder dyspné och visna betyder borttynande på isländska. Maedi och visna beskrevs tidigare som olika sjukdomar orsakade av olika virus, men då den första stammen av maedi isolerades sågs en serologisk likhet till visna och tidiga experiment fann att infektionerna orsakades av samma virus, som gav uppkomst till det nuvarande namnet: visna-maedivirus (Torsteinsdóttir *et al.* 2007). Viruset drabbar framför allt djurslaget får (MacLachlan & Dubovi 2017), och maedi är den vanligaste formen av sjukdomen (Caswell & Williams 2016), och är den enda formen som ses i Sverige (Andersson *et al.* 2021). Symptom ses sällan hos djur yngre än tre år då inkubationstiden är lång (MacLachlan & Dubovi 2017). Maedi ger upphov till en interstitiell pneumoni där symptom som kan ses är bland annat dyspné, hosta, nosflöde och viktnedgång. Gravyt påverkade djur kan bli liggande och abortera om de är dräktiga. Symptomen varar i cirka 3–8 månader innan djuret avlider. Vid visna får djuret en demyeliniserande encefalomyelit som leder till paralyt, viktnedgång, ibland fascikulationer i ansiktsmuskulaturen och till slut döden. Visna kan fortgå i flera år och kan varvas med perioder av remission där djuret mår bättre. Infektion med VMV kan i vissa fall även ge mastit och/eller artrit hos drabbade individer (MacLachlan & Dubovi 2017), vilket ger upphov till ett hårt juver eller hálta och svullna leder (Caswell & Williams 2016).

Kaprin artrit encefalit

Infektion med CAEV hos get leder till kronisk progressiv artrit hos vuxna getter och till pares/paralys hos 2–6 månaders gamla killingar (MacLachlan & Dubovi 2017). En ovanligare sjukdomsbild hos CAEV-infekterade getter innefattar interstitiell pneumoni och mastit. Kaprin artrit kommer oftast smygande och kan påverka flera synovialleder. Det är framför allt karpallederna som blir mest påtagligt affekterade, men även has-, knä-, bog-, kot- och vertebralleder kan affekteras. Progressiv leddegeneration kan leda till vätskeansamling, destruktion av ledbrosk och ankylos. Ligament och bursor kan även bli inflammerade, vilket leder till smärta. Den andra sjukdomsbilden är leukoencefalomyelit som är en progressiv demyeliniserande inflammation i hjärnan och/eller ryggmärgen och ses hos killingar. Denna lesion leder till pares/paralys och ataxi, men affekterade killingar är oftast fortsatt alerta och har generellt god aptit och syn. Leukoencefalomyelit har blivit mer ovanligt idag, och det är framför allt kaprin artrit som ses (MacLachlan & Dubovi 2017). I dagsläget är det dock oklart vilken symptombild som dominerar i Sverige.

2.1.5 Diagnostik

Det finns ingen guldstandard för att diagnostisera SRLV i dagsläget, men det finns ett flertal tester som kan användas för att detektera infektion. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), agar gel immunodiffusion (AGID), och andra serologiska tester kan användas för att detektera specifika antikroppar hos infekterade djur. Dessa serologiska tester anses användbara tack vare en hög sensitivitet (sannolikheten att ett test korrekt identifierar individer som är sjuka), och det är framför allt indirekt ELISA som dominerar inom diagnostiken. AGID har högre specificitet (sannolikheten att ett test korrekt identifierar individer som friska) än ELISA och används ofta som konfirmering av ELISA-resultat. Serologiska tester kan ge falska negativa provsvar på grund av virusets breda antigenspektrum samt en långsam serokonvertering hos djuret (Minguijón *et al.* 2015). Falskt positiva provsvar är inte lika vanligt förekommande (de Andrés *et al.* 2013), men kan ses hos avkommor som erhållit passiva antikroppar från en infekterad moder, förutsatt att de provtas tidigt i livet (Cutlip *et al.* 1988). PCR kan också användas för att detektera virus i blod och andra vävnader hos en individ i ett tidigare skede, innan djuret har serokonverterat (de Andrés *et al.* 2005). PCR kan dock ha svårt för att detektera viruspartiklar på grund av den stora genetiska variationen hos viruset samt en låg virusmängd i provmaterial som kan tas från levande djur.

I Sverige används indirekt ELISA för att detektera antikroppar mot SRLV i serumprover. I oktober 2021 ersatte SVA det dåvarande ELISA-testet till ett ELISA-test med högre sensitivitet, det vill säga från IDEXX CAEV/MVV Total

Ab (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, United States) till ID Screen MVV/CAEV (Innovative Diagnostics, Grabels, France). Prover som är seropositiva eller som har otydligt resultat testas om med samma ELISA-test. Om provresultat fortsatt är positivt används AGID för att konfirmera resultatet hos får, medan IDEXX används för att konfirmera getternas prover. Obduktion och histopatologi kan också användas som diagnostik för att detektera SRLV (Andersson *et al.* 2021).

2.1.6 Behandling

Som tidigare nämnts kan ett djur som blivit infekterat med SRLV inte bilda skyddande immunitet mot viruset. Det finns inte heller någon behandling mot SRLV, utöver understödjande behandling samt avlivning av djurskydds- och smittskyddsskäl. Detta har skapat ett intresse att ta fram nya strategier för att kunna immunisera djuren (Reina *et al.* 2013). Trots mycket forskning kring immunologi och vaccin så har inget effektivt vaccin ännu producerats. I dagsläget bygger strategierna mot infektion på kontrollprogram (Minguijón *et al.* 2015).

2.2 Kontrollprogram

De flesta kontrollprogram mot SRLV är frivilliga och djurägarna får själva stå för kostnaderna kring programmet. Kostnaderna för kontrollprogrammet i exempelvis Nederländerna är relativt höga i jämförelse med storlek och ekonomisk nytta för produktionsenheten eftersom SRLV-status baseras framförallt på individuella prover (Brinkhof *et al.* 2010). Om getägare i Norge skulle ha stått för alla kostnader kring det avslutade bekämpningsprogrammet Friskare geiter, där CAE ingick, skulle det inte ha varit lönsamt att vara ansluten till programmet förrän 20 år passerat enligt en studie av Nagel-Alne *et al.* (2014). Efter en studie av Brinkhof *et al.* (2007) poolar numera Nederländerna fem serumprover tagna från ackrediterade (MV/CAE-fria) besättningar i analysen (Peterson *et al.* 2022). Själva blodprovstagningen står dock för en stor del av kostnaden i programmet och i många länder är denna typ av provtagning begränsad till veterinärer (Brinkhof *et al.* 2010). Nederländerna diskuterar därmed fortsatt möjligheterna att få ned kostnaderna ytterligare, genom att exempelvis analysera tankmjölk för att tidigt upptäcka SRLV-smittade besättningar (Peterson *et al.* 2022).

Även i Sverige är kontrollprogrammet frivilligt och startade 1993 för MV och 1999 för CAE. Gård & Djurhälsan är utsedd av Jordbruksverket som huvudman för programmet, och ska därmed se till att kontrollen sker enligt Jordbruksverkets föreskrifter SJVFS 2015:17 om frivillig organiserad hälsokontroll av husdjur (K 152). I slutet på 2021 var 45 % av fårpopulationen och 13 % av getpopulationen anslutna till programmet (Andersson *et al.* 2021).

Programmet i Sverige består av ett antal kontrollbesök där serumprover tas på alla djur över ett års ålder (Gård & Djurhälsan 2022). Dessa prover analyseras sedan på SVA och om besättningen inte påvisas med antikroppar mot MV/CAE så erhåller besättningen M1/C1-status. Besättningen fyller även i en blankett om besättningsuppgifter och besättnings-kontakter. Efter 12–16 månader upprepas provtagningen och då kan besättningen erhålla M2/C2-status, och sedan M3/C3-status efter 24–28 månader. Till slut når besättningen MV/CAE-fri status då den provtagits igen efter ytterligare 24–28 månader. Då en besättning uppnått fri status behövs inga fler kontrollbesök i form av provtagning, utan då granskas besättningsens djurkontakter vartannat år. Om smitta påvisas i en ansluten besättning måste alla djur i besättningen slaktas och särskild sanering ska ske för att besättningen ska fortsatt vara ansluten till programmet (Gård & Djurhälsan 2020). Huvudmannen kan dock besluta om delsanering, där smittade djur och deras avkomma slaktas som alternativ till hela besättningen. Detta beslut måste dock ta hänsyn till förhållandena i den aktuella besättningen för att bedöma om det är möjligt för besättningen att uppnå M1/C1-status igen efter nya kontrollbesök.

2.3 Mjolk som provtagningsmedium

Mjolk har diskuterats som ett fördelaktigt provtagningsmedium för att diagnostisera SRLV (Minguijón *et al.* 2015). Provtagning av mjolk skulle vara mer kostnads-effektivt i ett kontrollprogram och är en mindre invasiv metod för djuren (Brinkhof *et al.* 2010; Persson *et al.* 2022).

2.3.1 Hur antikroppar hamnar i mjölken

Mjolkens immunoglobuliner kommer ursprungligen från blodet och från plasmacellernas produktion i mjölkkörtlarna (Larson *et al.* 1980). Idisslare har en epiteliokorial placenta och det är därmed essentiellt att maternella immunoglobuliner transporteras till kolostrum och mjolk för att avkomman ska få ett bra skydd tidigt i livet. Det är framför allt IgG som transporteras över blod-mjolk-barriären till kolostrum, medan IgA och IgM produceras av plasmaceller lokalt i juvret. Den största mängden immunoglobuliner kommer initialt från blodet. Larson (1958) kvantifierade mängden immunoglobuliner och visade att den minskade i blod för att sedan öka i mjolk, och kunde därmed fastställa antikropparnas ursprung.

Kolostrum och mjolk innehåller inte endast immunoglobuliner utan även celler, bland annat leukocyter såsom makrofager, lymfocyter, neutrofiler och plasmaceller (Larson *et al.* 1980). Monocyter som bär på proviralt DNA kan migrera från blod till juver, där de sedan kan differentiera till makrofager och utsöndras med mjölken

(Adjadj *et al.* 2019). Enligt Parmely *et al.* (1976) är makrofagen den celltyp som dominerar i kolostrum och mjölk. Makrofagerna i mjölken behåller sin funktion. Även lymfocyterna som migrerar till juvret och differentierar till plasmaceller kan utsöndras i mjölken och fortsatt agera som funktionella celler hos avkomman (Larson *et al.* 1980).

2.3.2 Jämförelse mellan serum och mjölk

Det finns ett flertal studier som har funnit god överensstämmelse mellan serumprover och mjölkprover vid serologiska analyser för SRLV (Mazzei *et al.* 2005; Brinkhof *et al.* 2010; Barquero *et al.* 2011; Adjadj *et al.* 2019; Persson *et al.* 2022). I Brinkhof *et al.* (2010) samlades individuella blod- och mjölkprover från 95 getter och 101 får fria från SRLV samt 101 getter och 87 får med SRLV. Proverna analyserades med Elitest MVV ELISA (HYPHEN BioMed, Andrésy, Franrike) och resulterade i en sensitivitet och specificitet på 98 % och 100 % för getmjölk, respektive 97 % och 98 % för fårmjölk jämfört med deras korresponderade serumprover. De kom fram till en korrelationskoefficient på 0,98 för getmjölk och 0,95 för fårmjölk. Barquero *et al.* (2011) utförde en liknande studie där 250 får och 163 getter provtogs för mjölk och blod. Överensstämmelsen mellan de parade blod- och mjölkproverna resulterade i en korrelationskoefficient på 0,79, vilket motsvarar en korrelation mellan blod och mjölk, om än något svag.

Persson *et al.* (2022) utförde en studie under svenska förhållanden där individuella mjölk- och serumprover insamlades från svenska getbesättningar. De fann en korrelation på över 90 % mellan proverna, samt en sensitivitet och specificitet på 90,3 % respektive 100 % för getmjölk. I studien diskuterades möjligheten att använda mjölkprover i ett framtida utrotningsprogram.

2.3.3 Hur skiljer det sig i olika laktationsstadium?

Mjölkprovers resultat kan eventuellt påverkas av vilket laktationsstadium djuret befinner sig i. Keen *et al.* (1996) provtog 129 får för kolostrum, mjölk och serum och analyserade dessa med en recombinant transmembrane envelope protein (rTM) ELISA. Fåren provtogs för mjölk 24 timmar efter lamning (kolostrum), 4 veckor efter lamning (mittlaktation) och 8 veckor efter lamning (strax före avvänjning). Kolostrum hade den högsta sensitiviteten (83,3 %) bland mjölkproverna vid analys. Den lägre sensitiviteten som uppskattades hos mjölk kan, enligt författarna, förklaras av en mindre mängd antikroppar i senare stadium av laktation, vilket också speglas i hur proverna späddes; 1:150 för kolostrum och serum, respektive 1:5 för de övriga mjölkproverna. Sammansättningen av leukocyter i mjölk hos nötkreatur analyserades av Park *et al.* (1992) och B-lymfocyterna varierade mellan

25 % vid partus till 7 % i sen laktation. Även Winnicka *et al.* (1999) har observerat att mängden B-lymfocyter minskar under laktationen hos getter.

Gosselin *et al.* (2018) undersökte mjölkprover från getter i olika laktationsstadium och hade som hypotes att kolostrum skulle kunna påverka provresultatet på grund av en högre koncentration immunoglobuliner, fett och celler. I studien kunde författarna dock inte finna att resultatet påverkades av dagar i mjölk, utan oavsett vilket laktationsstadium djuret befann sig i stämde det väl överens med de parade serumproverna. En större mängd fett i mjölkprover kan ge falska positiva provresultat (Julian Motha & Ralston 1994; Keen *et al.* 1996). Klintevall *et al.* (1991) rapporterade att mjölkprover som bestod av mastit-mjölk, kolostrum eller mjölk med en ökad mängd fett gav icke-specifika ELISA-reaktioner för enzootisk bovin leukos hos nötkreatur.

2.3.4 Poolning av mjölk

I dagsläget, som tidigare nämnts, bygger SRLV:s kontrollprogram på att testa individuella serumprover från får och getter. Det är dock dyrt och tidskrävande att samla in och analysera en stor mängd individuella prover för att detektera en eller flera positiva prover. Ett flertal studier har därmed undersökt möjligheten att poola prover för att effektivisera analysen (Brinkhof *et al.* 2007; Græsbøll *et al.* 2017). Poolning av prover innebär att ett bestämt antal prover från olika individer analyseras tillsammans, och om resultatet för poolen är negativ får alla individer i poolen ett negativt provresultat. Men om poolen istället får ett positivt resultat måste proverna analyseras om på ett sådant sätt att den individ eller de individer med positivt resultat kan identifieras (Brinkhof *et al.* 2007).

Poolning av provmaterial används redan i en relativt stor utsträckning inom veterinärmedicinen för att exempelvis bestämma besättningsstatus för en sjukdom eller som en indikator för att utreda en besättning (Græsbøll *et al.* 2016). Ett exempel på detta är att tankmjölk från mjölkkor kan undersökas för till exempel *Salmonella* Dublin, *Streptococcus agalactiae*, bovint virusdiarrévirus och bovint herpesvirus och på det sättet kan man få en uppfattning om någon av dessa patogener cirkulerar i besättningen i övervakningssyfte.

Hur många prover som kan användas i en pool beror på två faktorer: Hur mycket ett testpositivt prov kan spädas och fortsatt detekteras, vilket bestäms av testets sensitivitet, samt hur många testnegativa prover det finns bland de testpositiva, det vill säga prevalensen i populationen (Græsbøll *et al.* 2016). Græsbøll *et al.* (2016) testade olika poolningsscheman för komjölk med ELISA för *Salmonella* Dublin, *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* samt bovint virusdiarrévirus, och fann att poolning inte är kostnadseffektivt jämfört med individuell provtagning när

prevalensen i populationen är högre än 30 %. De fann även att det finns en möjlighet att minska testresurserna med upp till 80 %, även om poolen endast består av fem individer, om sjukdomsprevalensen är låg.

Brinkhof *et al.* (2010) undersökte i en studie hur mycket får- och getmjölk positiv för antikroppar mot SRLV kan spädas i negativ mjölk och fortsatt detekteras med hjälp av Elitest MVV ELISA. De poolade positiv mjölk från 36 får respektive 36 getter för sig och spädde sedan proverna i negativ mjölk i koncentrationer från 1:1 upp till 1:16 384. De olika spädningarna analyserades sedan antingen som de var eller så späddes de ytterligare 1:10 enligt testtillverkarens instruktioner. Olika resultat erhöles beroende på om proverna späddes ytterligare 1:10 eller om detta steg hoppades över. För de mindre utspädda proverna fann författarna en detektionsgräns för SRLV-antikroppar vid spädning 1:256, då det vanliga beräknade cut off-värdet på 0,30 användes. De mer utspädda proverna erhöles en detektionsgräns vid spädning 1:32, men då hade även författarna sänkt cut off-värdet till 0,10 för att öka sensitiviteten.

Tankmjölk

Provtagning av tankmjölk har också diskuterats som ett alternativ för att få ett mer kostnadseffektivt kontrollprogram, samt för att få en uppskattning av prevalens i populationen (Mazzei *et al.* 2005; Brinkhof *et al.* 2010; Persson *et al.* 2022). I Norge har det visat sig vara framgångsrikt att använda tankmjölk från getbesättningar i det nationella bekämpningsprogrammet Friskare geiter för CAE och landet är numera friförklarat från sjukdomen (Nagel-Alne *et al.* 2015). I studien av Persson *et al.* (2022) fann de att det var en tydlig skillnad mellan ELISA-resultaten för tankmjölk i getbesättningar med seronegativa djur jämfört med getbesättningar med seropositiva djur. De kom även fram till att alla seropositiva besättningar, förutom en, erhöles ett positivt tankmjölkprov i deras studie.

Tankmjölk kan i sig ses som en typ av poolning då många individer analyseras samtidigt i ett test. En skillnad däremot är att vid poolning tas en bestämd mängd mjölk från varje individ som ska ingå i poolen, vilket inte går att genomföra när tankmjölk används eftersom olika individer kan bidra med olika mängd mjölk och eventuella antikroppar (Brinkhof *et al.* 2010).

2.4 Antikroppars påverkan av frysning

Antikroppar kan påverkas av olika fysiska och kemiska nedbrytningsprocesser precis som andra proteiner (Wang *et al.* 2007). Antikroppar verkar vara något mer stabila än andra proteiner men instabilitet har bland annat observerats vid frysning och frystorkning. De två olika sätten som antikroppar visar instabilitet på är via

degradering och aggregering. Aggregation hos antikroppar är oftast en konsekvens av protein-proteininteraktioner. Aggregationshastigheten påverkas av många faktorer, som till exempel pH, temperatur, viskositet, långtidsförvaring och frysning-tiningsprocesser.

Låga temperaturer kan inducera aggregationen av antikroppar och detta anses bero på att den låga temperaturen reducerar den hydrofoba interaktionen hos protein, som är viktig för veckningen av proteinet. Detta resulterar i en ökad intermolekylär hydrofob interaktion, vilket i sin tur leder till aggregation (Wang *et al.* 2007). Frysning och tining av protein ger liknande effekt, men aggregationen är enligt Paborji *et al.* (1994) reversibel. Spadiut *et al.* (2020) fann också i en studie att aggregationen av monoklonala antikroppar ökade vid frysning. Frysning och tining samt förvaring kan även leda till fragmentering av antikroppar (Wang *et al.* 2007). Fragmenteringen kan se olika ut, till exempel att antikropparna förlorar sin lätta kedja eller att det sker en separation mellan en tung och en lätt kedja (Alexander & Hughes 1995).

Det finns endast ett fåtal studier där effekten av frysning och tining på antikropps-koncentration i mjölk har studerats. I en studie av Gosselin *et al.* (2018) undersöktes om fryst tinad mjölk kunde agera som ett alternativt substrat till fryst tinat serum i en kompetitiv ELISA för detektion av SRLV-antikroppar hos get. Mjölkproverna frystes vid -20 °C och tinades två gånger medan de parade serumproverna frystes och tinades en gång. De kom fram till att överensstämmelsen mellan fryst mjölk och serum var mycket god ($\kappa = 0,97$), och att endast två av 116 prover genererade olika resultat i mjölk jämfört med serum. I en annan studie av Demers-Mathieu *et al.* (2019) undersöktes effekten av frysning och tining på antikroppar i human bröstmjölk. Den kom fram till att IgA-, IgM- och IgG-koncentrationerna inte påverkades av frysning vid -20 och -80 °C och tining efter en timme. Efter 12 månaders förvaring av humant kolostrum vid -20 och -80 °C har dock Ramírez-Santana *et al.* (2012) kvantifierat att mängden IgA minskade. Dessa författare menar att kolostrum kan förvaras i upptill sex månader utan att förlora dess immunologiska egenskaper.

Det finns även studier som undersökt effekten av frysning och tining av serumprover och funnit att antikroppar är stabila. Cecchini *et al.* (1992) kunde fortsatt detektera antikroppar mot IBR/IPV i bovin serum efter 22 upprepade frysningar och tiningar av serumet. Positiva och negativa prover var fortsatt positiva respektive negativa efter behandlingen. Torelli *et al.* (2021) utförde en liknande studie på antikroppar mot influensavirus hos fåglar. Serumproverna testades efter upptill 14 cykler av frysning och tiningar och de fann att antikropparna var fortsatt stabila. Det har även utförts flera studier på människa där författarna studerat effekten av

multipla frysningar och tiningar på antikropps nivåer i serum (Pinsky *et al.* 2003). De har inte funnit någon statistiskt signifikant skillnad före och efter frysningarna. Petrakis (1985) menar dock på att upprepade frysningar och tiningar leder till en signifikant minskning av antikroppar i serum. Endast en frysning och tining kan minska IgM-aktiviteten med 25 %, likaså kan IgG-nivåer minska.

2.5 Jämförelse av Elitest och ID Screen

Som tidigare nämnts finns ingen guldstandard för analys av SRLV. Detta har medfört att det producerats många olika tester, där ibland ett flertal indirekta ELISA (Minguijón *et al.* 2015). Sensitivitet och specificitet för dessa analyser kan utvärderas på olika sätt (de Andrés *et al.* 2005). Ett sätt är att definiera infektionsstatus hos djuren genom att de ”sant negativa” testat negativt upprepade gånger och inte har någon kontakt med andra besättningar och att ”sant positiva” består av experimentellt infekterade djur. Ett annat sätt är att jämföra testets resultat med ett annat utvecklat test som referens och därefter bestämma om resultatet är sant eller falskt. Nackdelen med det sist-nämnda är att det jämförande testet inte kan veta om ett djur verkligen är infekterat och därmed kan felaktig klassificering av ett djurs sjukdomsstatus ske.

På senare år har ytterligare en metod utvecklats för att utvärdera ett tests sensitivitet och specificitet samt uppskattning av sann prevalens, vilket är latent class analysis (LCA), där epidemiologer kan undgå behovet av ett guldstandardtest som referenstest (Cheung *et al.* 2021). Det finns olika latent class analysis, däribland Bayesian latent class analysis (BLCA) där en individs sanna infektionsstatus anses som icke-observerad och därmed ”latent”. Med hjälp av BLCA går det numera att uppskatta en mer sann sensitivitet och specificitet hos ett test där djurens infektionsstatus är okänd.

Jerre *et al.* (2022) utvärderade tre kommersiella ELISA-tester för VMV med BLCA för att kunna uppskatta sensitivitet, specificitet och prevalens i sex fårbesättningar provtagna för serum. De testade ID Screen och Elitest, vilka är de två tester som användes i denna studie, samt IDEXX MVV/CAEV. De fann att ID Screen och Elitest hade signifikant högre sensitivitet (99,3 % respektive 97,4 %) än IDEXX (79,5 %). ID Screen och IDEXX hade högre specificitet (99,1 % respektive 99,7 %) jämfört med Elitest (93,7 %). De fann även att användningen av ID Screen och Elitest i serietolkning gav den högsta sensitiviteten och specificiteten (96,7 % och 100 %), samt det högsta positiva prediktiva värdet (proportionen av de testpositiva som verkligen är sjuka) för populationen med lägst prevalens i studien.

3. Material och metod

3.1 Studiepopulation och provtagning av får och get

I ett projekt som leds av Gård & Djurhälsans och som startade mars 2022, har fårgårdar som inte är anslutna till MV-programmet möjlighet att skicka in fem fårmjölksprover till SVA för analys av antikroppar mot VMV. Utifrån deras resultat kontaktades ett antal fårbesättningar per telefon, varav fyra antikroppspositiva och fem antikroppsnegativa besättningar valde att frivilligt delta i denna studie. Dessutom valde ytterligare en gård utan tidigare analysresultat att delta. I de fyra antikroppspositiva gårdarna var det ett av fem mjölkprover som var testpositivt i tidigare analys.

Fåren provtogs för individuella serum- och mjölkprover av samma provtagare. Serumproverna samlades från jugularvenen med vakuumsystem och det resulterade i sammanlagt 171 prover. Mjölksproverna togs från ena eller bägge juverdelarna och resulterade i totalt 117 prover. Fåren provtogs mellan juli och september 2022, vilket var i slutet på laktationen för besättningarna, förutom hos en besättning där tackorna var sinlagda. Denna besättning har därmed ej provtagits för mjölk. Lammen gick fortfarande tillsammans med tackorna förutom i två besättningar varav en nyligen hade skiljt av lammen från tackorna. För mer information kring besättningarna se tabell 1.

I slutet på september provtogs även 17 getter från en mjölkgetbesättning med känd positiv CAE-status där kontakten förmedlats via SVA. Individuella serum- och mjölkprover samlades in på liknande sätt som för fåren.

En remiss fylldes i hos varje besättning med följande data om individuella djur/prover: provtagna djurs ID-nummer, ras, ålder och lamningsdatum, samt provtagningsmaterial. För varje besättning dokumenterades även: besättningens SE-nummer, totalt antal djur i besättningen, antal djur under ett år, antal djur mellan ett och tre år och antal djur över tre år.

3.2 Provhantering och analys

Proverna förvarades i kylbox under bilresorna från besättningarna för att sedan förvaras i kyl fram till att de skickades. Kylboxen höll generellt en temperatur kring 4–12 °C och kylan hade en temperatur på 5 °C. Proverna skickades med post till SVA dagen efter provtagning alternativt nästkommande vardag om proverna togs en fredag eller helg och förvarades då däremellan i kyl precis som tidigare.

Vid ankomst till SVA skrevs proverna in i journalsystemet Svala och blodproverna centrifugerades i 3 000 rpm i 10 minuter och sparades sedan i kyl fram till analys. Även mjölkproverna förvarades i kyl fram till analys men utan föregående centrifugering.

3.2.1 ELISA ID Screen

Samtliga serum- och mjölkprover analyserades med indirekt ELISA med testkitet ID Screen MVV/CAEV (IDvet, Grabels, Frankrike). ELISA-plattorna är coatade med olika peptider från VMV/CAEV: TM, gp135 och p25, och det bildas ett antigen-antikroppskomplex om VMV/CAEV-antikroppar är närvarande i provet. Serumproverna analyserades i ELISA-roboten Evolyzer, medan mjölkproverna analyserades manuellt enligt tillverkarens anvisningar. Två negativa och två positiva kontroller användes vid varje körning. Kontroller och serumprover spädades 1:20, medan mjölkprover spädades 1:2. Proverna avlästes sedan i en spektrofotometer kopplad till dator vid våglängd 450 nm och S/P% beräknades automatiskt i spektrofotometerprogrammet för varje prov enligt nedanstående formel.

$$S/P\% = 100 \times \frac{Prov - NC\bar{x}}{PC\bar{x} - NC\bar{x}}$$

S/P står för sample to positive ratio, och innebär att provet jämförs med den positiva kontrollen. Utifrån detta kan man få en uppfattning om mängden antikroppar i ett prov. Om ett prov innehåller en större mängd antikroppar än den positiva kontrollen kommer provet anta ett högre S/P%-värde. I denna analys tolkas ett S/P%-värde under eller lika med 50 % som negativt, ett värde mellan 50 % och 60 % tolkas som en gråzon och ett värde lika med eller över 60 % tolkas som positivt. Spektrofotometern kan mäta värden upptill 263 %, men om proverna antar ett högre värde kommer de benämnas som ”overflow” av programmet.

3.3 Poolning av getmjölkprover

Från getgården med ett flertal seropositiva djur valdes tre mjölkprover från tre individer med olika S/P%-värden för poolning. De positiva mjölkproverna spädades

var för sig i tankmjölk från en annan seronegativ besättning på en förspädningsplatta i koncentrationer från 1:1 till 1:128. SVA tillhandahöll den negativa besättningens tankmjölk. Samma spädning för samma djur upprepades fyra gånger för djur ett och två med S/P%-värde 131 % respektive 263 %, medan spädningarna för djur tre med S/P%-värdet ”overflow” upprepades tre gånger. Den seronegativa tankmjölken analyserades även separat i fyra exemplar för att försäkra att den var fortsatt negativ.

Proverna analyserades, som tidigare, med ID Screen enligt tillverkarens anvisningar. Detta innebar att mjölkproverna späddes ytterligare 1:2 med testkitets spädningsbuffert, medan de positiva och negativa kontrollerna späddes 1:20. Proverna avlästes sedan i spektrofotometer vid 450 nm och resultatet beräknades med samma formel som tidigare.

3.4 ELISA Elitest

I en tidigare studie av Persson *et al.* (2022) samlades 213 mjölkprover och 10 tankmjölkprover från 10 olika mjölkgetbesättningar under 2018. Proverna frystes och analyserades sedan för CAEV-antikroppar med Elitest MVV/CAEV (HYPHEN BioMed, Neville sur Oise, Frankrike). Proverna har förvarats i frys på SLU i fyra års tid och har tinats minst en gång tidigare. I denna studie valdes 92 av dessa prover ut. Det resulterade i två besättningar där alla tidigare getter, inklusive deras tankmjölkprover ingick, två besättningar där endast deras tankmjölkprover ingick, två besättningar där alla individmjölkprover ingick, samt en besättning där cirka 20 % av tidigare individmjölkprover ingick. Dessa prover analyserades återigen i denna studie för att undersöka hur frysning av mjölk påverkar provresultatet. De fyra tankmjölkproverna analyserades inte vidare och kommer därmed inte att presenteras i resultatdelen.

Proverna tinades till rumstemperatur inför upprepning av analys. För de individuella mjölkproverna användes spädningen 1:50 och för tankmjölkproverna användes spädningen 1:5 som för den tidigare studien, samt enligt rekommendation av TINE Masttilllaboratorium i Molde. Elitest MVV/CAEV (HYPHEN BioMed) användes som testkit för att det skulle vara möjligt att jämföra provresultaten med de tidigare. Proverna analyserades även i duplikat för att minimera felkällor. Analyserna utfördes enligt tillverkarens anvisningar och absorbansen uppmättes vid våglängderna 450 nm och 595 nm med ThermoLabsystems Multiskan. Cut off-värdet beräknades med hjälp av två positiva och två negativa kontroller. Om provvärdet var över cut off-värdet betraktades resultatet som positivt och om provet var under cut off-värdet betraktades det som negativt.

3.4.1 Upprepning av analys med ID Screen

I denna studie jämfördes även protokollen för ID Screen och Elitest. Detta utfördes genom att mjölkproverna som analyserats om med Elitest förvarades i kyl för att sedan analyseras med ID Screen. Den första körningen med 46 prover förvarades i kyl i cirka två veckor fram till analys, medan den andra körningen med resterande 46 prover från andra besättningar och individer förvarades i kyl i en dag fram till analys. Proverna analyserades sedan med ID Screen (IDvet, Grabels, Frankrike) enligt tillverkarens anvisningar.

3.5 Statistiska analyser

Datan sammanställdes, punktdiagram och stapeldiagram ritades och Pearsons korrelationskoefficient beräknades med Microsoft Excel. McNemars parade chi-två-test användes för att undersöka om det fanns en signifikant skillnad (med 95 % konfidensnivå) mellan mjölkprovernans resultat från 2018 jämfört med 2022 analyserade med Elitest, samt om det fanns en signifikant skillnad mellan resultaten då de analyserades med Elitest 2022 jämfört med ID Screen 2022. McNemars test användes även för att undersöka om det fanns en signifikant skillnad mellan mjölkproverna analyserade 2018 med Elitest jämfört med när de analyserades 2022 med ID Screen. McNemars test beräknades med hjälp av EpiTools Epidemiological Calculators (Ausvet, Canberra, Australien).

4. Resultat

4.1 Fårens provresultat

Insamling av provmaterial från fåren resulterade i 171 serumprover och 117 mjölkprover. Tabell 1 visar antalet lakterande får, antalet provtagna får, ras och län för de tio fårbesättningar som ingick i studien. De 117 fåren med mjölkprover hade även parade serumprover. De övriga 54 djuren som inte var lakterande provtogs endast för serumprover. Dessa djur har exkluderats från tabell 2 och figur 1 då sambandet mellan parade mjölk- och serumprover undersöktes.

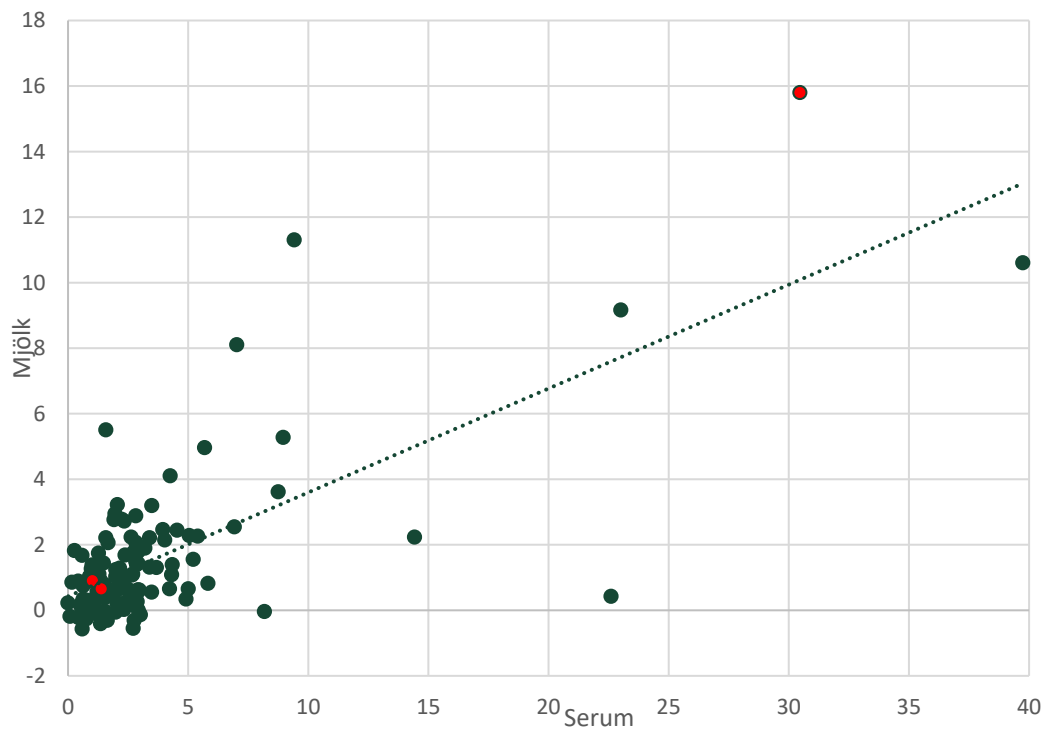
Inga positiva mjölk- eller serumprover erhöles från de får som ingick i studien vid analys för VMV-antikroppar med ID Screen ELISA när en cut-off på 60 % användes. Tabell 2 visar antalet positiva och negativa parade mjölk- och serumprover hos fåren, där det går att utläsa att alla 117 får testade negativt i både mjölk och serum som provtagningsmedium. Figur 1 visar sambandet mellan mjölkprovernas och serumprovernas S/P%-värden. Utifrån detta beräknades en korrelationskoefficient på 0,72. En relativ specificitet på 100 % beräknades för analys av mjölkproverna då analys av serumproverna användes som referenstest. De rödmarkerade punkterna i figur 1 är får som tidigare testat positivt i mjölk i Gård & Djurhälsans projekt, men som var negativa vid den andra provtagningen i både mjölk och serum.

Tabell 1. Hur populationen såg ut för de 171 får som ingick i studien med avseende på antal lakterande får, antal provtagna får, ras och vilket län besättningen befann sig i.

Besättning	Antal lakterande får	Antal provtagna får	Ras
A	13	15	Dorper, dorperkorsning, gotlandsfår, gotlandskorsning
B	25	39	Gotlandsfår, gotland/texelkorsning
C	30	33	Gotlandsfår, gotlandskorsning
D	10	29	Gotlandsfår
E	9	10	Gotlandsfår, gotlandskorsning
F	6	7	Gutefår
G	12	13	Gutefår
H	8	11	Gutefår
I	4	4	Gutefårkorsning
J	0	10	Korsning: texel, dorset, leicester

Tabell 2. Antalet MV-positiva och MV-negativa parade serum- och mjölkprover för 117 får som ingick i studien.

		Serum		
		Positiv	Negativ	Summa
Individmjölk	Positiv	0	0	0
	Negativ	0	117	117
	Summa	0	117	117



Figur 1. Sambandet mellan S/P%-värdena för parade serum- och mjölkprover från 117 får som ingick i studien. Proverna analyserades med ID Screen ELISA (IDvet) för detektion av VMV-antikroppar. De röda punkterna är de individer som testade positivt på mjölk i Gård & Djurhälsans projekt.

4.1.1 Fårmjolkprover i olika laktationsstadium

Av de 171 får som ingick i denna studie var 22 av dessa, uppdelade på tio besättningar, tidigare provtagna för mjölkprover i Gård & Djurhälsans projekt. I deras projekt skickade besättningarna själva in mjölkprover från fyra till fem får under ett tillfälle som analyserades för VMV-antikroppar med ID Screen ELISA på SVA. I vår studie provtogs samma får från nio besättningar för mjölk senare i laktationen och analyserades på samma sätt som tidigare. I besättning H föll två får bort eftersom en inte gick att få tag på i hagen och den andra hade avlidit tidigare under våren. I besättning J kunde endast serumprover tas eftersom fåren var sinlagda vid provtagning. Besättning X provtogs inte i denna studie men besättningen analyserades för VMV-antikroppar i serum då den gick med i kontrollprogrammet.

Det var fem får som testade positivt på mjölkproverna i Gård & Djurhälsans projekt (den första provtagningen). Av dessa fem får testades ingen positivt i vare sig mjölk eller serum vid den andra provtagningen. I tabell 3 går det att utläsa hur S/P%-värdena har förändrats för de fyra-fem individerna från varje besättning, samt hur många dagar i mjölk djuren befann sig i vid de två olika provtagningarna. Samtliga av de tidigare positiva fåren var provtagna inom 20 dagar efter lamning vid den första provtagningen. Det maximala antalet dagar som passerat vid den första

provtagningen var 99 dagar, och vid den andra provtagningen hade det gått minst 82 dagar efter lamning. Åldrarna varierar mellan 1–10 år.

Tabell 3. S/P%-värdena för mjölkproverna från de fyra-fem fåren från besättningarna A-F, H-J och X som ingick i Gård & Djurhälsans projekt samt i denna studie. Både S/P%-värdena från den första provtagningen och den andra provtagningen ingår, samt hur många dagar i mjölk som fåren varit lakterande, och deras ras och ålder.

Best.	Individ	Ras	Ålder (år)	Första	prov.	Andra	prov.
				Dagar i mjölk	S/P (%)	Dagar i mjölk	S/P (%)
A	1	Gotlandsfår	7	4	92,60	105	0,90
	2	Gotlandsfår	2	18	-1,65	101	0,85
	3	Dorper- korsning	3	23	-1,31	106	0,26
	4	Dorper- korsning	3	19	-2,16	102	0,22
	5	Dorper- korsning	4	18	-2,05	101	-0,06
B	1	Gotlandsfår	10	53	3,92	116	1,74
	2		6	61	3,95	124	0,16
	3		5	25	4,82	88	0,65
	4		3	42	5,50	105	-0,04
	5		2	41	4,58	105	-0,31
C	1	Gotlands- korsning	7	3	139,08	119	15,80
	2		6	1	26,30	117	1,76
	3		9	1	18,50	114	1,19
	4		4	2	11,60	115	3,22
	5		7	2	4,84	118	3,61
D	1	Gotlandsfår	7	59	0,36	110	-0,12
	2		4	79	0,78	130	1,03
	3		4	67	0,07	118	0,45
	4		2	63	3,11	114	0,25
	5		2	63	0,39	114	0,004
E	1	Gotlands- korsning	3	3	1,36	130	0,47
	2		6	1	42,50	116	1,26
	3		3	62	1,07	106	0,63
	4		2	58	1,24	102	0,62
	5		2	56	0,66	100	0,75

F	1	Gutefår	5	95	0,13	113	-0,004
	2		7	87	0,40	105	1,24
	3		4	65	-0,49	83	-0,22
	4		4	99	-0,25	116	0,17
	5		4	82	-0,41	99	-0,02
H	1	Gutefår	4	12	-0,45	109	0,82
	2		4	15	-0,85	110	-0,21
	3		7	18	-1,09	-	-
	4		6	29	-1,27	126	-0,04
	5		8	13	-1,46	-	-
I	1	Gutefår- korsning	1	20	86,0	94	0,65
	2		1	8	2,35	82	1,55
	3		1	10	1,79	82	0,56
	4		~7	8	1,47	84	1,30
J	1	Korsning: texel, finull, dorset, leicester	4	16	57,1	-	1,27*
	2		6	27	0,80	-	2,58*
	3		5	29	4,97	-	2,83*
	4		6	17	7,06	-	1,52*
	5		7	27	5,68	-	1,76*
X	1			0	131,1	-	3,75*
	2			0	44,1	-	0,84*
	3			0	36,7	-	2,75*
	4			13	1,21	-	1,22*
	5			18	1,1	-	2,07*

Best. = besättning,

Provt. = provtagning

Fetmarkerade siffror = de positiva S/P%-värdena.

* = serumprover

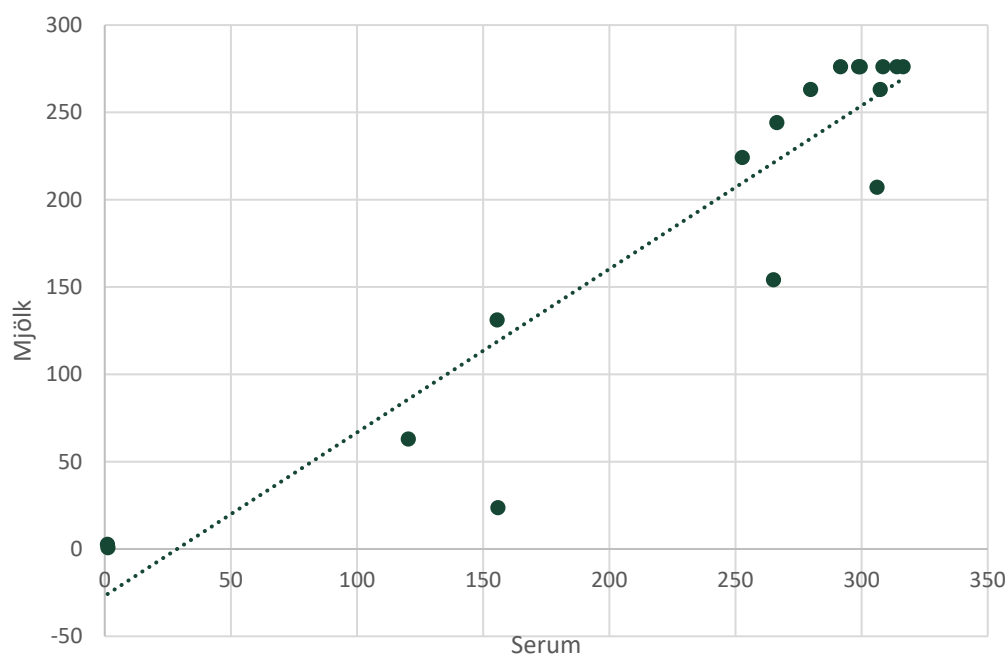
4.2 Getternas provresultat

Under studiens gång insamlades parade mjölk- och serumprover från 17 getter av rasen svensk lantras. Tabell 4 visar hur väl de parade serum- och mjölkproverna överensstämde med avseende på ett positivt eller negativt provresultat för CAE vid analys med ID Screen. Av de 15 individer som testade positivt för serum testade 14 positivt i motsvarande mjölkprover. I figur 2 ses sambandet mellan S/P%-värdena för mjölkproverna och serumproverna från de 17 getterna då de analyserats med ID Screen ELISA för CAE-antikroppar. Detta resulterade i en korrelationskoefficient på 0,94. Den relativa sensitiviteten och specificiteten beräknades till 93,3 % respektive 100 % för analysen av mjölkproverna då analysen av serumproverna användes som referenstest.

Vid den konfirmerande analysen av de positiva serumproverna med IDEXX erhöll endast 9 av de 15 proverna ett positivt resultat och 5 bedömdes som negativa för CAE. Tabell 5 visar hur väl de parade serumproverna analyserade med IDEXX stämmer överens med resultatet för mjölkproverna analyserade med ID Screen. Av de 14 getter som testade positivt för CAE i mjölk med ID Screen var endast 9 av dessa även positiva i serum med IDEXX. De övriga 5 getterna med ett positivt mjölkresultat erhöll ett negativt serumprov. Dessa 5 individer var dock initialt positiva på serumproverna vid den första analysen med ID Screen, som tidigare nämnt. Figur 3 visar sambandet mellan S/P%-värdena för mjölkproverna och de konfirmerade serumproverna och vid beräkning av korrelation erhölls en korrelationskoefficient på 0,27.

Tabell 4. Antalet CAE-positiva och CAE-negativa parade serum- och mjölkprover från de 17 getterna som ingick i studien analyserade med ID Screen.

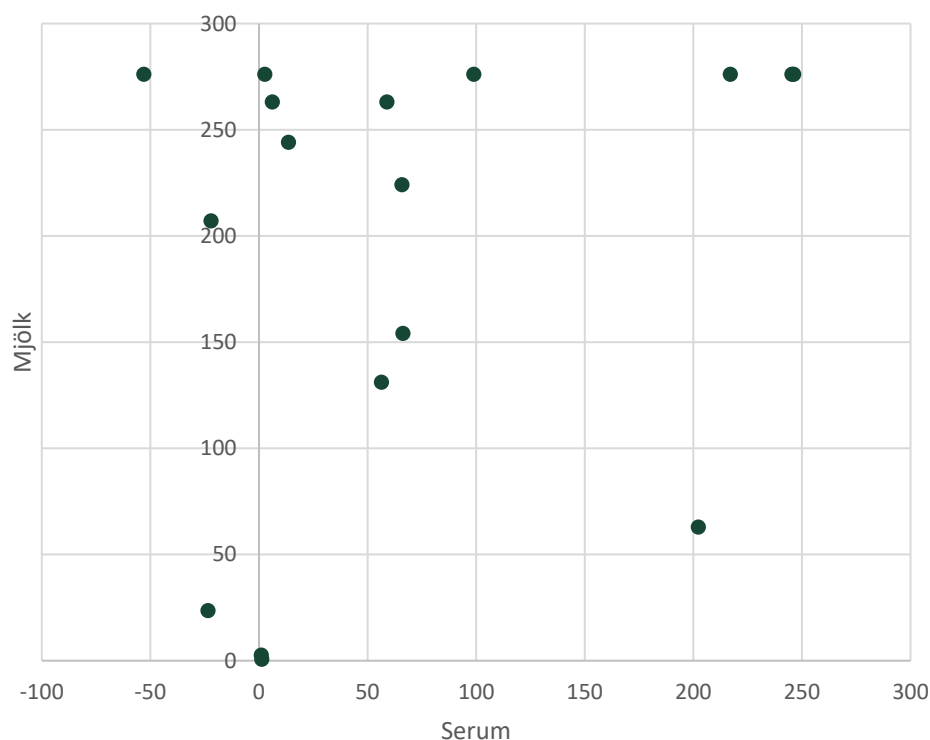
		Serum		ID Screen
		Positiv	Negativ	Summa
Individmjölk	Positiv	14	0	14
	Negativ	1	2	3
ID Screen	Summa	15	2	17



Figur 2. Sambandet mellan S/P%-värden för parade serum- och mjölkprover från de 17 getter som ingick i studien. Proverna analyserades med ID Screen ELISA (IDvet) för detektion av CAE-antikroppar.

Tabell 5. Antalet CAE-positiva och CAE-negativa parade serum- och mjölkprover från de 17 getterna som ingick i studien. Serumproverna är analyserade med IDEXX och mjölkproverna med ID Screen.

		Serum IDEXX		
		Positiv	Negativ	Summa
Individmjölk	Positiv	9	5	14
	Negativ	0	3	3
ID Screen	Summa	9	8	17



Figur 3. Sambandet mellan S/P%-värdena för parade serum- och mjölkprover från de 17 getter som ingick i studien. Mjölkprovernas värden är samma som tidigare (analyserade med ID Screen), medan serumproverna analyserades om med IDEXX ELISA för detektion av CAE-antikroppar och erhöll nya värden.

4.2.1 Poolning av getmjölk

De tre getmjölkproverna med olika S/P%-värden (131 %, 263 % och "overflow") erhöll olika resultat gällande detektionsgräns för CAE-antikroppar då de poolades i negativ getmjölk. Geten med ett S/P%-värde på 131 % kunde förspädas till 1:2 och fortsatt ha ett positivt resultat, därefter var mjölkproverna från den geten negativa. Geten med S/P%-värdet 263 % kunde förspädas till 1:4 och antikroppar kunde då fortsatt detekteras. Geten med S/P%-värdet "overflow" kunde spädas till 1:128 och fortsatt vara positiv för antikroppar.

Tabell 6. Poolningsschemat för de tre getter som ingick i poolningen och deras respektive S/P%-värden. NoCalc innebär att provet innehöll en större antikropps-koncentration än spektrofotometern kunde registrera.

S/P%-värden	Spädning									
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		
Get 131 %	130	84,6	44,9	23,5	9,69	6,33	3,9	1,42		
	149	89,1	52	22,6	9,1	8,36	3,37	0,87		
	155	99	56,5	26,7	13,1	9,09	4,81	1,4		
	172	112	60,6	31,7	11,9	10,7	4,59	2,18		
Get 263 %	208	132	88,4	56,5	22,7	17,2	8,32	4,52		
	168	122	70,1	40	21,6	15	6,67	2,33		
	198	136	75,8	39,1	25,5	13,8	6,33	2,91		
	193	135	72,3	41,9	22,4	17,8	7,9	35,6		
Get overflow	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	216	
	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	238	208	
	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	NoCalc	220	201	

Fetmarkerade siffror = de positiva S/P%-värdena med högst spädning.

4.2.2 Frysning av getmjölk

I tabell 7 går det att utläsa hur 88 CAE-positiva och CAE-negativa mjölkprover från 2018 överensstämmer med samma mjölkprover 2022 efter fyra års frysning och minst två tiningar. Under 2018 var 13 prover positiva, och av dessa är nu åtta negativa och fem fortsatt positiva vid analys med Elitest. De 75 mjölkproverna som var negativa under 2018 var fortsatt negativa efter frysning. Med hjälp av McNemars parade chi-två-test beräknades ett p-värde på 0,013, vilket innebär att

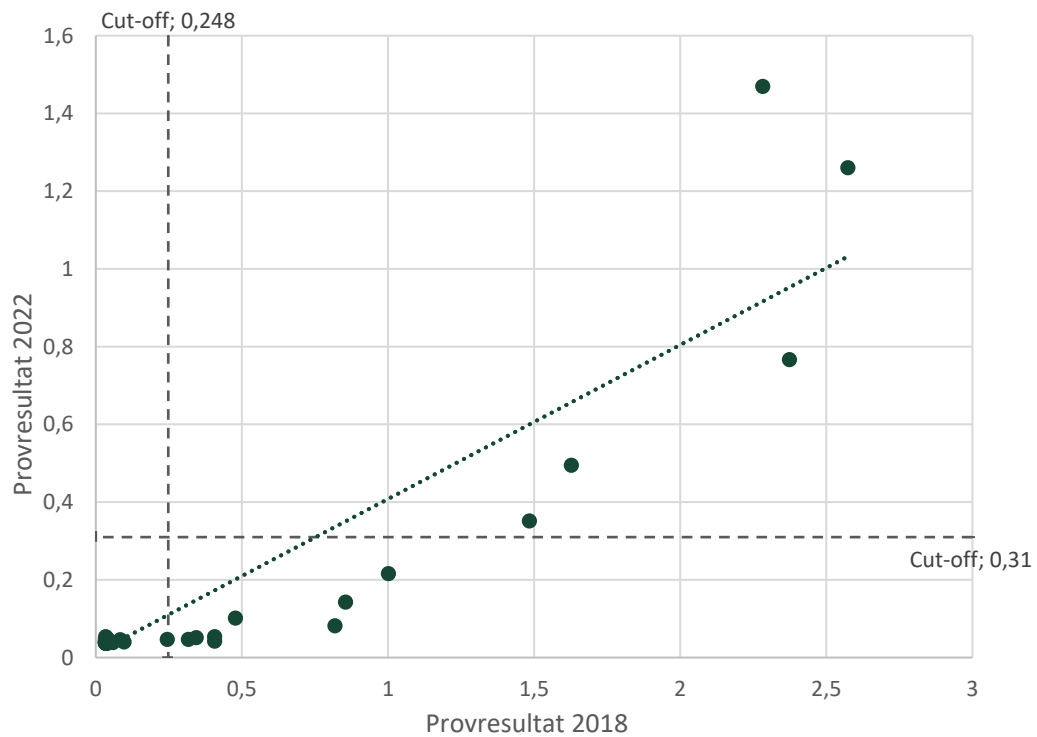
det är en signifikant skillnad (med 95 % konfidensnivå) mellan proverna för när de analyserades 2018 och för när de analyserades om efter fyra års frysning.

Figur 4 visar sambandet mellan provresultatet från 2018 och 2022 analyserade med Elitest. En cut-off på 0,31 beräknades för proverna 2018, medan cut off-värdet beräknades till 0,248 2022. Mjölkprovernas resultat från 2018 har generellt ett högre absorbansvärde än deras resultat från 2022. Korrelationskoefficienten beräknades till 0,91.

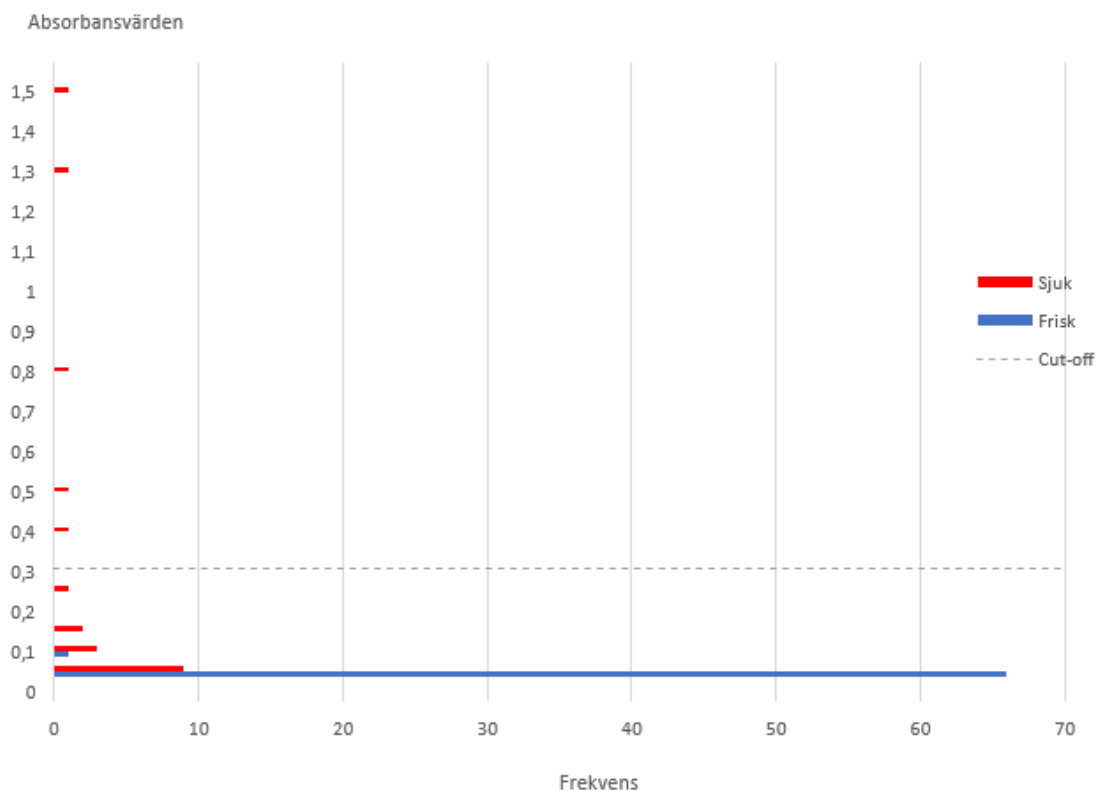
Figur 5 visar fördelningen av absorbansvärdena i intervall om 0,05 för getmjölkproverna efter analysen 2022. Positiva absorbansvärden är över cut off-linjen inritad i diagrammet, medan negativa absorbansvärden ligger under linjen. De positiva proverna kommer ifrån en besättning. Alla prover från denna besättning har rödmarkerats och benämnts som sjuk besättning, även de negativa proverna från denna besättning. De övriga fyra besättningarna har benämnts som friska besättningar eftersom de inte har några sjuka individer.

Tabell 7. Antalet CAE-positiva och CAE-negativa mjölkprover från fem getbesättningar från en analys 2018 och en upprepad analys 2022. Proverna har varit frysta i fyra års tid och tinats vid minst två tillfällen. Proverna är analyserade med Elitest ELISA.

		Individmjölk 2018		
		Positiv	Negativ	Summa
Individmjölk 2022	Positiv	5	0	5
	Negativ	8	75	83
	Summa	13	75	88



Figur 4. Sambandet mellan absorbansvärdena för getmjölkproverna som analyserats 2018 och sedan analyserats åter igen 2022 med samma analysmetod (Elitest). Totalt analyserades 88 mjölkprover från 88 getter. Den streckade linjen utgående från x-axeln är cut off-värdet som beräknats 2018, medan den streckade linjen utgående från y-axeln är cut off-värdet som beräknats i denna studie 2022.



Figur 5. Stapeldiagrammet visar fördelningen av absorbansvärdena för de 88 getters mjölkprover som analyserades om efter fyra års frysning (från 2018). Absorbansvärdena är indelade i intervall om 0,05. Cut off-värdet är inritat som en streckad linje i diagrammet.

4.2.3 Jämförelse av ID Screen och Elitest

I studien jämfördes även två olika ELISA-tester: ID Screen och Elitest, vilka använder sig av något olika protokoll för att analysera VMV/CAEV-antikroppar i serum och mjölk. ID Screen späder mjölkproverna 1:2, medan Elitest späder mjölkproverna 1:50. I tabell 8 jämfördes de olika resultaten med avseende på ett positivt eller ett negativt resultat för CAE-antikroppar för de 88 getmjölkproverna som analyserats med Elitest och ID Screen. ID Screen klassificerar fler individer som positiva än Elitest (totalt nio fler). Med hjälp av McNemars chi-två-test beräknades ett p-värde på 0,008. Detta innebär att det är en signifikant skillnad (med 95 % konfidensnivå) mellan proverna när de analyserades med Elitest jämfört med när de analyserades med ID Screen.

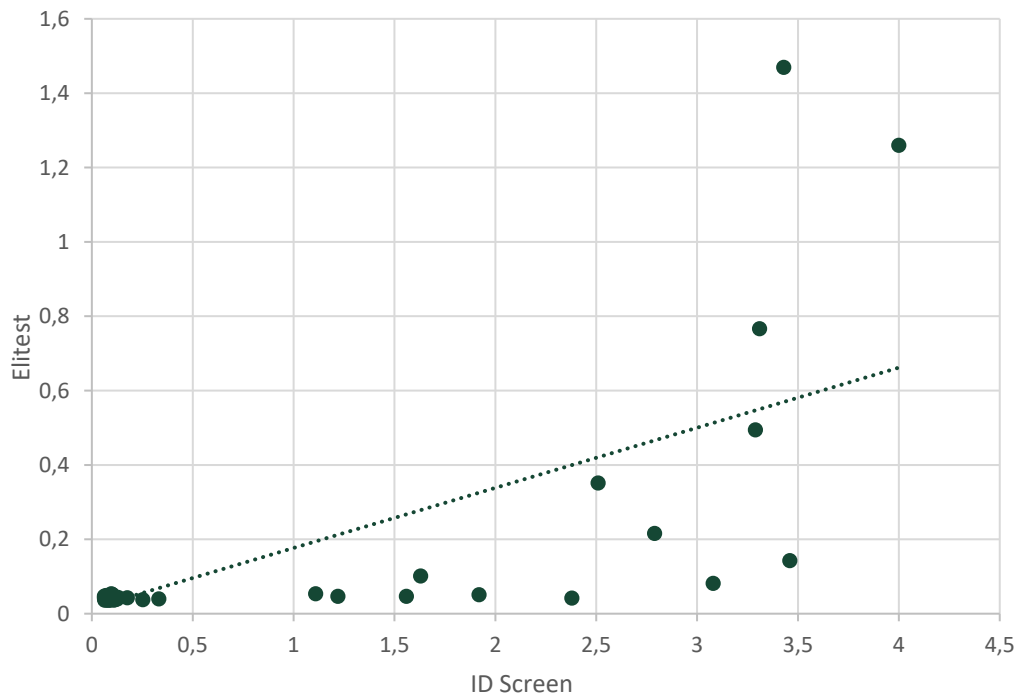
Då mjölkproverna analyserade 2022 jämfördes med deras korresponderande serumprovsresultat från tidigare studie (Persson *et al.* 2022) erhöll ID Screen en sensitivitet på 100 %, jämfört med Elitest som endast erhöll en sensitivitet på 35 %.

Figur 6 visar sambandet mellan ID Screen och Elitest. ID Screen visar generellt högre absorbansvärden än Elitest för samma mjölkprover. Korrelationen mellan de

två testerna beräknades till 0,72. Tabell 9 visar antalet mjölkprover som är positiva respektive negativa med ID Screen 2022 jämfört med Elitest 2018. I detta fall beräknades ett p-värde på 1 med McNemars chi-två-test. Detta innebär att det inte finns en signifikant skillnad (med 95 % konfidensnivå) mellan proverna för när de analyserades med Elitest 2018 jämfört med när de analyserades med ID Screen 2022. Figur 8 visar sambandet mellan absorbansvärdena för getmjölkproverna med analys med Elitest 2018 samt analys med ID Screen 2022. Korrelationen mellan dessa beräknades till 0,9.

Tabell 8. Antalet CAE-positiva och CAE-negativa mjölkprover från fem getbesättningar med två olika ELISA-analyser: Elitest och ID Screen.

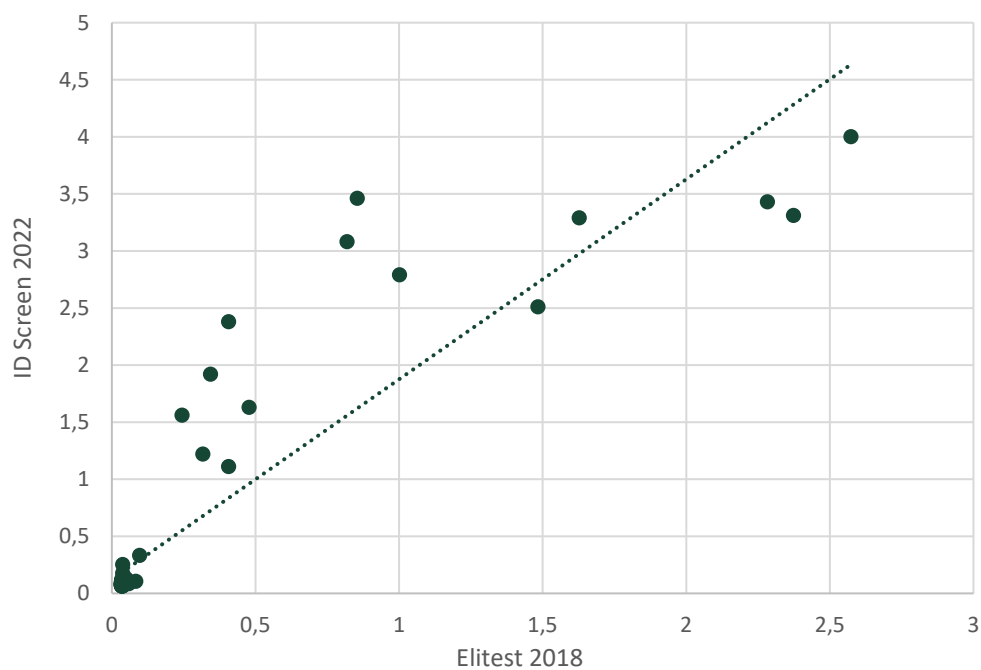
		Elitest		
		Positiv	Negativ	Summa
ID Screen	Positiv	5	9	14
	Negativ	0	74	74
	Summa	5	83	88



Figur 6. Sambandet mellan absorbansvärdena i getmjölk för ID Screen och Elitest för 88 individer som ingick i studien.

Tabell 9. Antalet CAE-positiva och CAE-negativa mjölkprover analyserade med Elitest 2018 jämfört med analysen med ID Screen 2022 för samma mjölkprover.

		Elitest 2018		
		Positiv	Negativ	Summa
ID Screen 2022	Positiv	13	1	14
	Negativ	0	74	74
	Summa	13	75	88



Figur 8. Sambandet mellan absorbansvärdena i getmjölk för Elitest 2018 jämfört med ID Screen 2022 för 88 getter som ingick i studien.

5. Diskussion

5.1 Får: Överensstämmelse mellan mjölk och serum

I denna studie undersöktes huruvida individuella mjölkprover skulle kunna ersätta serumprover i MV/CAE-kontrollprogrammet. De 117 får som provtogs för mjölk och serum i studien erhöll samtliga ett negativt provsvar för VMV-antikroppar för både mjölkprover och serumprover vid analys med ID Screen ELISA. Detta tyder på en god överensstämmelse mellan mjölk och serum som provtagningsmedium, vilket även andra studier har kunnat visa (Keen *et al.* 1996; Mazzei *et al.* 2005; Brinkhof *et al.* 2010; Barquero *et al.* 2011). Utifrån resultatet kan en relativ specificitet på 100 % konkluderas om analys av serumproverna används som referenstest för analys av fårmjölken. Den relativa sensitiviteten för analysen av mjölkproverna kan inte beräknas eftersom det inte fanns några positiva individer i vare sig mjölk eller serum i de tio besättningar som provtagits.

Korrelationen mellan de parade mjölk- och serumprovernas S/P%-värden var endast 0,72 trots den goda överensstämmelsen mellan serumets och mjölkens resultat utifrån tabell 2. Majoriteten av de parade proverna antar värden som ligger nära varandra i den nedre kvadranten, se figur 1. Dock går det att utläsa att serumproverna generellt antar ett högre S/P%-värde än deras korresponderande mjölkprover. Detta är särskilt markant då serumproverna antar högre S/P%-värden än 10 %. Skillnaderna i S/P%-värdet kan bero på hur kompositionen av serum och mjölk skiljer sig åt. S/P%-värdet beror på hur mycket ljus provet absorberar, vilket i sig beror på kompositionen i provet. Serumprover har generellt en större antikroppsmängd än mjölkprover (Motha & Ralston 1994; Keen *et al.* 1996; Adjadj *et al.* 2019), men proverna i denna studie var alla negativa och VMV-antikroppar är därmed inte närvarande. Proverna kan dock innehålla andra antikroppar, proteiner och elektrolyter som kan absorbera ljus och i detta fall gjort att en del prover antar högre S/P%-värden än andra. En möjlig orsak till att korrelationskoefficienten inte antar ett värde närmre ett kan bero på de avvikande värden som är med i studien. Det är särskilt en punkt som sticker ut som antar ett värde på cirka 23 % i serum, men endast 0,4 % i mjölk.

Utifrån denna studie anses mjölkprover som ett lämpligt alternativ till serumprover hos får på grund av den höga specificiteten, men i en framtida studie vore det värdefullt att inkludera positiva individer för att se hur sensitiviteten för mjölkprover är hos får och hur detta skulle påverka lämpligheten.

5.2 Get: Överensstämmelse mellan mjölk och serum

Getternas parade serum- och mjölkprover stämde också väl överens vid analys med ID Screen ELISA och mjölkprover anses därmed, även för getter, som ett lämpligt provtagningsmedium. En relativ sensitivitet och specificitet beräknades till 93,3 % respektive 100 % om analys av serumproverna används som referenstest för analys av getmjölken. Den studerade populationen i denna studie bestod dock endast av 17 individer och en större studiepopulation hade varit lämplig för att dra en säkrare slutsats.

Getternas parade serum- och mjölkprovers S/P%-värden visade en högre korrelation, ett värde på 0,94, jämfört med fårens då ID Screen ELISA användes som analysmetod. Andra studier har kunnat visa på en liknande korrelationskoefficient (Julian Motha & Ralston 1994; Adjadj *et al.* 2019; Persson *et al.* 2022). Det var endast för en individ som resultatet för mjölk och serum inte stämde överens, då serumprovet var positivt och mjölkprovet var negativt. Det skulle kunna bero på någon felkälla vid analys eller vid provtagning, alternativt någon genetisk faktor (Caswell & Williams 2016). Även Adjadj *et al.* (2019) fann i sin studie att det var sju individer, av totalt 321, som erhöll ett positivt serumprov och ett negativt mjölkprov. De diskuterar den större mängden antikroppar i serumproverna jämfört med mjölkproverna som en möjlig anledning, vilket också går att utläsa i figur 2 för proverna i denna studie.

På SVA konfirmeras getternas serumprover med IDEXX ELISA som har en specificitet på 99,7 % för serum enligt Jerre *et al.* (2022). En god specificitet innebär att testet kommer att minska andelen falskt positiva prover. IDEXX har dock en sämre sensitivitet än ID Screen (79,5 % jämfört med 99,3 %) (Jerre *et al.* 2022), och det finns därmed en risk att infekterade individer inte upptäcks. Då serumresultatet med IDEXX jämfördes med mjölkprovresultatet med ID Screen kunde inget tydligt samband ses och en korrelationskoefficient på endast 0,27 erhöles. Det är dock viktigt att poängtera att det är två olika analyser som har jämförts och det går därmed inte att dra några större slutsatser mer än att mjölkproverna analyserades med ID Screen antar högre S/P%-värden än serumproverna som analyserades med IDEXX. Det skulle vara intressant att se hur mjölkprover analyserade med IDEXX förhåller sig till motsvarande serumprover.

5.3 Fårens mjölkprover i olika laktationsstadium

Ytterligare en frågeställning som har undersökts i denna studie var om antikropps-nivåer varierar i mjölk beroende på vilket laktationsstadium djuret befinner sig i. Av de prover som undersökts i denna studie var det fem får som erhöll ett positivt mjölkprovresultat i Gård & Djurhälsans projekt. Antalet dagar i mjölk varierade mellan tre till tjugo dagar för dessa individer, men gemensamt för dem är att de alla erhöll ett negativt serum- och mjölkprovresultat vid den senare provtagningen i denna studie. Besättning J och X kunde dock endast provtas för serum då fåren var sinlagda vid det andra provtagningstillfället. Mjölksproverna insamlades andra gången cirka 100 dagar in i laktationen, vilket innefattar sen laktation för fåren. En hypotes är att koncentrationen antikroppar minskar i mjölk under laktationens gång (Keen *et al.* 1996; Adjad *et al.* 2019), men detta anses inte så troligt eftersom deras parade serumprover också är negativa och de skulle med stor sannolikhet förbli positiva vid den senare provtagningen.

En mer trolig anledning kan vara att mjölken har olika komposition i olika laktationsstadier. Kolostrum innehåller mer fett och protein än vanlig mjölk (Sjaastad *et al.* 2016). Fåret med ett positivt mjölkprov från besättning X provtogs samma dag som lamning, därmed bestod provet av kolostrum. Detta kan vara en möjlig orsak till det falskt positiva provsvaret (Klintevall *et al.* 1991; Motha & Ralston 1994; Keen *et al.* 1996). Mjölksprovet ansågs vara falskt positivt eftersom serumprovet för fåret var negativt vid en senare provtagning. Även två andra får från denna besättning provtogs samma dag som lamning och erhöll relativt höga S/P%-värden, om än inte tillräckligt höga för att erhålla ett positivt resultat. Varför de övriga fyra fåren erhöll positiva mjölkprovresultat vid den första provtagningen var svårare att hitta möjliga orsaker till. Enligt Vesna *et al.* (2002) har fårmjölk en mindre mängd fett i början av laktationen, efter kolostrumfasen, än senare i laktationen. Utifrån detta är en ökad mängd fett troligtvis inte anledningen till de falskt positiva provsvaren i detta fall. Kompositionen av mjölk påverkas dock av många andra orsaker, så som ras, ålder, antal lamningsperioder, vikt, antal lamm och skötsel-faktorer (Vesna *et al.* 2002), vilka ej har undersökts i denna studie.

Enligt en studie av Keen *et al.* (1996) fann de att kolostrum hos får hade en högre sensitivitet (83,3 %) än de övriga mjölksproverna på grund av en högre mängd antikroppar i början av laktationen. En nackdel med kolostrum är dock att det innehåller en större mängd fett och har en hög viskositet. Gosselin *et al.* (2018) undersökte mjölk hos getter i olika laktationsstadium och kunde inte finna att resultatet påverkades beroende på vilket laktationsstadium djuret befann sig i. En brist i deras studie är dock att de endast undersökte olika laktationsstadium hos olika individer och inte olika laktationsstadium hos samma individ. Utifrån denna studies resultat kan ett positivt mjölkprov från tidig laktation med fördel följas upp

senare i laktationen för att förhindra falskt positiva provsvar. Det ska dock poängteras att endast VMV-negativa individer undersöktes i denna studie och det är alltså endast för dessa individer som denna slutsats kan appliceras. Det skulle vara mer fördelaktigt att även undersöka hur positiva mjölkprover ter sig i olika laktationsstadium, samt använda sig av en större studiepopulation och fler laktationsstadier för att kunna dra en slutsats när i tiden det är lämpligt att provta fåren för VMV-antikroppar i mjölk. En liknande studie för get skulle även vara lämpligt.

5.4 Poolning getmjölk

Som tidigare nämnts bygger MV/CAE-kontrollprogrammet på individuella serumprover. I denna studie har vi undersökt möjligheten att poola individuella mjölkprover genom att poola tre olika CAE-positiva getmjölkprover i CAE-negativ tankmjölk och analysera med ID Screen. Detektionsgränsen för proverna med ett S/P%-värde på 131 % och 263 % resulterade i 1:2 respektive 1:4 då en cut-off på 60 % användes. Då proverna späddes mer än så erhöll de ett negativt resultat. Det gick därmed inte att poola dessa getmjölkprover i någon större utsträckning innan de klassificerades som negativa. Geten med ett S/P%-värde som antog ”overflow” kunde spädas upp till 1:128 och fortsatt detekteras med avseende på antikroppar och därmed erhålla ett positivt värde.

Brinkhof *et al.* (2010) fann i sin studie en detektionsgräns vid 1:256 för får- och getmjölk då de inte spädde proverna ytterligare enligt tillverkarens instruktioner (1:10). När de i stället spädde proverna enligt instruktionerna fann de en detektionsgräns vid 1:32, men då hade de sänkt cut off-värdet från 0,30 till 0,10. En viktig skillnad jämfört med denna studie är att de poolade 36 får och 36 getter för sig i negativ mjölk i olika koncentrationer, samt att de analyserade proverna med Elitest. I denna studie poolades endast tre enskilda individer i negativ mjölk och analyserades med ID Screen. ID Screen har en något bättre sensitivitet än Elitest (Jerre *et al.* 2022), vilket bör ha medfört ett bättre resultat.

Andra studier, bland annat Brinkhof *et al.* (2010) och Persson *et al.* (2022) har kunnat visa att tankmjölkprover från getter är ett möjligt alternativ i ett nationellt övervakningsprogram, och Norge har haft framgångsrika resultat för att övervaka CAE på detta sätt (Nagel-Alne *et al.* 2015). Persson *et al.* (2022) fann i sin studie att det gick att upptäcka ett positivt tankmjölkprov hos en besättning med en besättningsprevalens på endast 9,5 % (baserat på serum- och individmjölkprover). Det skulle dock vara fördelaktigt med en mer omfattande studie där fler besättningar inkluderas för att se hur besättningsprevalensen bör vara för att tankmjölk ska kunna användas. Tankmjölk skulle därefter kunna användas som ett första steg

i provtagningen för att sedan gå över till antingen individuella mjölkprover som analyseras var för sig eller att pooler av prover analyseras för att minska kostnaderna ytterligare. Det hade varit betydelsefullt att undersöka vart detektionsgränsen går för mjölkprover när de inte späds enligt tillverkarens instruktioner, och om det går att sänka cut off-värdet för mjölkprover som poolas för att lättare fånga upp positiva pooler samt för att kunna inkludera fler individer i en pool.

5.5 Frysning av getmjölk

Prover sparas ofta en viss tid i frys för att kunna användas för exempelvis övervakning i senare skede. I nuläget är det oftast serumprover som sparas, vilka inte verkar påverkas av frysning och tining i någon större utsträckning (Cecchini *et al.* 1992; Torelli *et al.* 2021). Det har dock inte utförts särskilt många studier som undersöker hur mjölkprover påverkas av frysning. I denna studie analyserades 88 getmjölkprover på nytt efter att ha förvarats i fryst tillstånd i fyra års tid och tinats minst två gånger. Det gick att se en signifikant skillnad mellan proverna för när de analyserades första gången 2018 och när de nu analyserades 2022 ($p=0,013$). Av de 13 prover som var positiva under 2018 var nu åtta negativa. De negativa proverna förblev negativa efter frysning. Det sågs ett tydligt samband mellan proverna 2018 och 2022, med en korrelationskoefficient på 0,91. Absorbansvärdet 2018 var generellt högre än det korresponderande absorbansvärdet 2022.

Resultatet i denna studie divergerar en del från andra studier som utförts. Gosselin *et al.* (2018) fann i deras studie en god överensstämmelse mellan fryst serum och fryst mjölk med avseende på SRLV-antikroppar. Då serum har en god antikroppsstabilitet tyder deras studie på att även mjölk har det. Det framgår dock inte hur lång tid proverna varit frysta innan analys i deras studie. Demers-Mathieu *et al.* (2019) undersökte human bröstmjölk och fann att antikroppskoncentrationen inte påverkades efter frysning vid -20 och -80°C och tining efter en timme. Detta är dock en relativt kort frysningstid och Ramírez-Santana *et al.* (2012) fann att mängden IgA minskade i humant kolostrum efter förvaring i frys i 12 månader. Ramírez-Santana *et al.* (2012) resultat stämmer mer överens med resultatet i denna studie.

Anledningen till att mängden antikroppar minskade i getmjölkproverna i denna studie är inte klarlagd och vi kan endast hypotisera möjliga anledningar. Som tidigare nämnts kan en låg temperatur resultera i en ökad intermolekylär hydrofob interaktion vilket påverkar veckningen hos protein (Wang *et al.* 2007), samt att frysning och tining kan leda till att antikroppar fragmenterar. En möjlig förklaring i det här fallet kan vara att en viss mängd antikroppar har fragmenterat i de positiva

proverna, vilket har medfört att de erhåller ett negativt resultat vid den upprepade analysen.

I en framtida studie vore det intressant att undersöka hur länge mjölkprover kan vara frysta och fortsatt användas för att detektera SRLV-antikroppar. Ytterligare en intressant aspekt var att ID Screen kunde detektera alla positiva prover som tidigare varit positiva, inklusive ytterligare ett mjölkprov som inte Elitest kunde detektera 2018. Enligt McNemars chi-två-test fanns det ingen signifikant skillnad mellan dessa analyser ($p=1$). Det extra positiva mjölkprovet som ID Screen upptäckte var positivt i serum enligt tidigare resultat från studien där proverna insamlats (Persson *et al.* 2022). En möjlig förklaring till detta är att proverna späds 1:2 i ID Screen medan de späds 1:50 i Elitest, vilket kan medföra att ID Screen har en bättre sensitivitet.

5.6 Jämförelse av ID Screen och Elitest getmjölk

Protokollen för två olika ELISA (ID Screen och Elitest) för mjölkprover jämfördes i denna studie för att undersöka om och hur de skiljer sig åt. Enligt resultatet klassificerade ID Screen fler mjölkprover som positiva än Elitest. Då mjölkproverna jämfördes med deras korresponderande serumprovsresultat från en tidigare studie (Persson *et al.* 2022) erhöll ID Screen en sensitivitet på 100 %, jämfört med Elitest som endast erhöll en sensitivitet på 35 %. Detta överensstämmer även med Jerre *et al.* (2022) där de fann att ID Screen har en högre sensitivitet, dock vad gäller serum. Utifrån vårt resultat beräknades ett p-värde på 0,008, vilket tyder på att det är en signifikant skillnad mellan de två olika analyserna. ID Screen kan utifrån detta resultat anses som en mer lämplig analysmetod. Det är dock viktigt att uppmärksamma att i denna studie var det endast ett litet antal positiva prover och mjölkproverna hade dessutom varit frysta. I en tidigare studie på dessa mjölkprover erhölls en sensitivitet på 90,3 % med Elitest som analys (Persson *et al.* 2022). För ett mer pålitligt resultat vid jämförelse av ID Screen och Elitest på getmjölk bör fler prover analyseras och en längre tids frysning av proverna innan analys bör undvikas.

Efter den första körningen med Elitest av de 42 individuella mjölkproverna förvarades dessa i kyl i cirka två veckor fram till analys med ID Screen, medan den andra körningen med resterande 46 prover förvarades endast en dag i kyl fram till analys. Detta verkar inte ha påverkat resultatet med avseende på klassificering av positiva och negativa prover. Alla prover som var positiva ingick bland de prover som förvarats i kyl i två veckor.

5.7 Studiedesign

Det finns ett antal svagheter med denna studie som kan ha påverkat resultatet. Dels var deltagande i studien frivilligt vilket kan ha medfört att det är en överrepresentation av besättningar med engagerade djurägare, dels var urvalet av besättningar inte slumpmässigt då besättningarna valdes utifrån vart de befann sig i landet, samt tidigare provresultat. Ytterligare en svaghet i studien är att serum- och mjölkproverna inte analyserades på samma sätt eftersom serumproverna analyserades i robot (Evolzyer), och mjölkproverna analyserades manuellt. Då prover analyseras manuellt behöver man ta hänsyn till den mänskliga faktorn. De utförda analyserna utfördes inte heller av samma person vilket också blir en felkälla. Vid användning av McNemars parade chi-två-test bör de oeniga resultaten inte anta ett värde under tio för att få ett mer korrekt resultat. Detta uppfylldes inte i denna studie, vilket kan bero på att för få positiva prover ingick av de 88 getter som analyserades på nytt.

5.8 Konklusion

Utifrån denna studie konkluderas att mjölk är ett lämpligt provtagningsmedium för får respektive getter vid analys med ID Screen ELISA. De korresponderande serumproverna antar generellt ett högre S/P%-värde än mjölkproverna, vilket bör hållas i åtanke. Det bör även utföras fler studier där positiva får och fler getter inkluderas för att dra en mer säker slutsats. Av de fem får som hade ett positivt mjölkprov mellan dag 1–20, var samtliga negativa i mjölk/serum efter cirka dag 100. Resultatet pekar mot att det kan vara en fördel att följa upp positiva mjölkprover som erhållits tidigt i laktationen med en provtagning senare i laktationen för att undvika falskt positiva provsvar. Men för att besvara frågeställningen om hur antikroppsmängden varierar i mjölk beroende på laktationsstadium krävs studier där infekterade individer undersöks.

Pooler av mjölkprover skulle eventuellt kunna bli aktuellt i framtiden. I studien fann vi att olika mjölkprover kan spädas olika mycket beroende på deras S/P%-värde, och att den med högst värde kunde spädas 1:128 och eventuellt mer. Det behövs fler studier för att se hur detta kan användas praktiskt. Fyra års frysning har en påverkan på mjölkprover vid analys med Elitest, men ID Screen lyckades fånga upp fler positiva prover än Elitest. Utifrån detta dras slutsatsen att ID Screen har en bättre sensitivitet och är en mer lämplig analysmetod än Elitest.

Referenser

- Adjadj, N.R., Vicca, J., Michiels, R. & De Regge, N. (2019). (Non-)sense of milk testing in small ruminant lentivirus control programs in goats. Comparative analysis of antibody detection and molecular diagnosis in blood and milk. *Viruses*, 12 (1). <https://doi.org/10.3390/v12010003>
- Alexander, A.J. & Hughes, D.E. (1995). Monitoring of IgG antibody thermal stability by micellar electrokinetic capillary chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 67 (20), 3626–3632. <https://doi.org/10.1021/ac00116a002>
- Andersson, E., Axén, C., Bujila, I., Chenais, E., Dahlquist, M., Dryselius, R., Eriksson, H., Ernholm, L., Forsgren, E., Grant, M., Gröndahl, G., Hallgren, G., Hammarén, B., Hjertqvist, M., Hultén, C., Hällbom, H., Höök, H., Jansson, D., Jinnerot, T., Johansson Wensman, J., Jonsson, J., Karlsson Lindsjö, O., Kjellsdotter, S., König, U., Lahti, E., Larsdotter, E., Latorre-Margalef, N., Lindblad, M., Lundén, A., Nilsson, A., Nilsson, O., Nöremark, M., Omazic, A., Ordell, A., Persson, Y., Persson-Waller, K., Pettersson, E., Rodriguez Ewerlöf, I., Rosendal, T., Sjölund, M., Ståhl, K., Sundqvist, L., Söderlund, R., Thelander, M., Troell, K., Uhlhorn, H., Wallensten, A., Wallgren, P., Widgren, S., Wikström, C., Windahl, U., Wistedt, J., Young, B., Yousef, N., Zohari, S., Ågren, E. & Ågren, E. (2021). *Surveillance of infectious diseases in animals and humans in Sweden 2021*. https://www.sva.se/media/8dabe4461e9e2cc/1-2_web.pdf [2022-10-14]
- de Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A. & Harkiss, G.D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 107 (1), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.012>
- de Andrés, X., Ramírez, H., Bertolotti, L., San Román, B., Glaria, I., Crespo, H., Jáuregui, P., Minguijón, E., Juste, R., Leginagoikoa, I., Pérez, M., Luján, L., Badiola, J.J., Polledo, L., García-Marín, J.F., Riezu, J.I., Borrás-Cuesta, F., de Andrés, D., Rosati, S., Reina, R. & Amorena, B. (2013). An insight into a combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152 (3), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.017>
- Barquero, N., Arjona, A., Domenech, A., Toural, C., de las Heras, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A. & Gomez-Lucia, E. (2011). Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Veterinary Record*, 168 (1), 20–20. <https://doi.org/10.1136/vr.c4951>

- Blacklaws, B.A. (2012). Small ruminant lentiviruses: immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35 (3), 259–269.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.003>
- Brinkhof, J.M.A., Houwers, D.J. & van Maanen, C. (2007). Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Ruminant Research*, 70 (2), 194–199.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.03.003>
- Brinkhof, J.M.A., Houwers, D.J., Moll, L., Dercksen, D. & van Maanen, C. (2010). Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Veterinary Microbiology*, 142 (3), 193–198.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.060>
- Caswell, J.L. & Williams, K.J. (2016). Chapter 5 - Respiratory System. I: Maxie, M.G. (red.) *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2*. 6. ed. W.B. Saunders. 465-591.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5318-4.00011-5>
- Cecchini, G., Bekele, T. & Kasali, O.B. (1992). The effect of repeated freezing and thawing of serum on the activity of antibodies. *Veterinary Research Communications*, 16 (6), 425–428. <https://doi.org/10.1007/BF01839019>
- Cheung, A., Dufour, S., Jones, G., Kostoulas, P., Stevenson, M.A., Singanallur, N.B. & Firestone, S.M. (2021). Bayesian latent class analysis when the reference test is imperfect. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 40 (1), 271–286. <https://doi.org/10.20506/rst.40.1.3224>
- Crawford, T.B., Adams, D.S., Cheevers, W.P. & Cork, L.C. (1980). Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, 207 (4434), 997–999.
<https://www.jstor.org/stable/1683575> [2022-11-09]
- Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Schmerr, M.J.F. & Brogden, K.A. (1988). Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Veterinary Microbiology*, 17 (3), 237–250. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90068-5)
- Demers-Mathieu, V., Huston, R.K., Markell, A.M., McCulley, E.A., Martin, R.L., Spooner, M. & Dallas, D.C. (2019). Differences in maternal immunoglobulins within mother's own breast milk and donor breast milk and across digestion in preterm infants. *Nutrients*, 11 (4), 920. <https://doi.org/10.3390/nu11040920>
- Gjenstad, G.E. (2007). *Validering av CAEV-antistoffpåvisning i tankmelk*. Mastittlaboratoriet i Molde.
- Gosselin, V.B., Dufour, S., Zhang, M.Z. & Middleton, J.R. (2018). Sensitivity and specificity of a competitive ELISA using frozen-thawed milk or serum for the diagnosis of small ruminant lentivirus infection in goats using a Bayesian latent class model. *Small Ruminant Research*, 167, 29–31.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.08.004>
- Græsbøll, K., Andresen, L.O., Halasa, T. & Toft, N. (2016). *How few pooled tests are needed to detect a single positive sample?* National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Frederiksberg.

- Græsbøll, K., Andresen, L.O., Halasa, T. & Toft, N. (2017). Opportunities and challenges when pooling milk samples using ELISA. *Preventive Veterinary Medicine*, 139, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.08.001>
- Gård & Djurhålsan (2020). *Plan och riktlinjer för organiserad frivillig övervakning avseende Maedi Visna (MV) hos får samt Caprin Artrit Encephalit (CAE) hos get*. <https://www.gardochdjurhalsan.se/wp-content/uploads/2020/04/mv-cae-pr-inkl-bilagor-2020-03-18.pdf> [2022-10-19]
- Gård & Djurhålsan (2022). *Maedi Visna/CAE-kontroll hos får och get 2021*. <https://www.gardochdjurhalsan.se/wp-content/uploads/2022/02/9110-maedi-visna-pop-sammanfattning-2021.pdf> [2022-10-19]
- Jerre, A., Nordstoga, A.B., Dean, K.R. & Holmøy, I.H. (2022). Evaluation of three commercial ELISA tests for serological detection of maedi-visna virus using Bayesian latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 208, 105765. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105765>
- Julian Motha, M.X. & Ralston, J.C. (1994). Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Veterinary Microbiology*, 38 (4), 359–367. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90153-8)
- Keen, J., Kwang, J., Littledike, E.T. & Hungerford, L.L. (1996). Ovine lentivirus antibody detection in serum, colostrum and milk using a recombinant transmembrane protein ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51 (3), 253–275. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05518-5](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05518-5)
- Klintevall, K., Näslund, K., Svedlund, G., Hajdu, L., Linde, N. & Klingeborn, B. (1991). Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *Journal of Virological Methods*, 33 (3), 319–333. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90032-U](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90032-U)
- Larson, B.L. (1958). Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *Journal of Dairy Science*, 41 (8), 1033–1044. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(58\)91047-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(58)91047-6)
- Larson, B.L., Heary, H.L. & Devery, J.E. (1980). Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 63 (4), 665–671. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)82988-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82988-2)
- MacLachlan, N.J. & Dubovi, E.J. (red.) (2017). Chapter 14 - Retroviridae. I: *Fenner's Veterinary Virology*. 5. ed. Boston: Academic Press. 269–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00014-3>
- Mazzei, M., Carrozza, M.L., Bandecchi, P., Mazzanti, G., Mannelli, A. & Tolari, F. (2005). Evaluation of an ELISA to detect antibodies to maedi-visna virus in individual and pooled samples of milk from sheep. *Veterinary Record*, 157 (18), 552–555. <https://doi.org/10.1136/vr.157.18.552>
- de Miguel, R., Arrieta, M., Rodríguez-Largo, A., Echeverría, I., Resendiz, R., Pérez, E., Ruiz, H., Pérez, M., de Andrés, D., Reina, R., de Blas, I. & Luján, L. (2021). Worldwide prevalence of small ruminant lentiviruses in sheep: A systematic review and meta-analysis. *Animals*, 11 (3), 784. <https://doi.org/10.3390/ani11030784>

- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B. & Juste, R.A. (2015). Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*, 181 (1), 75–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.007>
- Nagel-Alne, G.E., Asheim, L.J., Hardaker, J.B., Sølverød, L., Lindheim, D. & Valle, P.S. (2014). The Norwegian Healthier Goats programme – A financial cost–benefit analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 114 (2), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.02.002>
- Nagel-Alne, G.E., Valle, P.S., Krontveit, R. & Sølverød, L.S. (2015). Caprine arthritis encephalitis and caseous lymphadenitis in goats: use of bulk tank milk ELISAs for herd-level surveillance. *Veterinary Record*, 176 (7), 173–173. <https://doi.org/10.1136/vr.102605>
- Paborji, M., Pochopin, N.L., Coppola, W.P. & Bogardus, J.B. (1994). Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse–human monoclonal antibody. *Pharmaceutical Research*, 11 (5), 764–771. <https://doi.org/10.1023/A:1018948901599>
- Park, Y.H., Fox, L.K., Hamilton, M.J. & Davis, W.C. (1992). Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, 75 (4), 998–1006. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77842-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77842-4)
- Parmely, M.J., Beer, A.E. & Billingham, R.E. (1976). In vitro studies on the T-lymphocyte population of human milk. *Journal of Experimental Medicine*, 144 (2), 358–370. <https://doi.org/10.1084/jem.144.2.358>
- Persson, Y., Andersson, E., Frössling, J. & Wensman, J.J. (2022). Occurrence of CAE and CLA in Swedish dairy goats and comparison of serum and milk as sampling material. *Dairy*, 3 (1), 190–198. <https://doi.org/10.3390/dairy3010015>
- Peterson, K., van den Brom, R., Aalberts, M., Bogt-Kappert, C. ter & Vellema, P. (2022). Loss of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) herd accreditation: characteristics, diagnostic approach, and specific follow-up scenarios on large dairy goat farms. *Pathogens*, 11 (12), 1541. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121541>
- Petrakis, N.L. (1985). *Selection, Follow-up, and Analysis in Prospective Studies: A Workshop : Proceedings of a Conference Held at the Waldorf-Astoria Hotel, New York, N.Y., October 3-5, 1983*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute.
- Pinsky, N.A., Huddleston, J.M., Jacobson, R.M., Wollan, P.C. & Poland, G.A. (2003). Effect of multiple freeze-thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10 (1), 19–21. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.1.19-21.2003>
- Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., Andrés, D. & Martínez, H. (2013). Small ruminant lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*, 5 (4), 1175–1207. <https://doi.org/10.3390/v5041175>
- Ramírez-Santana, C., Pérez-Cano, F.J., Audí, C., Castell, M., Moretones, M.G., López-Sabater, M.C., Castellote, C. & Franch, A. (2012). Effects of cooling and freezing

- storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. *Journal of Dairy Science*, 95 (5), 2319–2325. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5066>
- Reina, R., Andrés, D.D. & Amorena, B. (2013). Immunization against small ruminant lentiviruses. *Viruses*, 5 (8), 1948–1963. <https://doi.org/10.3390/v5081948>
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. 3. uppl. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Spadiut, O., Gundinger, T., Pittermann, B. & Slouka, C. (2020). Spatially resolved effects of protein freeze-thawing in a small-scale model using monoclonal antibodies. *Pharmaceutics*, 12 (4), 382. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040382>
- Statens jordbruksverk (2021). *Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om biosäkerhetsåtgärder samt anmälan och övervakning av djursjukdomar och smittämnen*. SJVFS 2021:10. https://jvdoc.sharepoint.com/sites/sjvfs/Shared%20Documents/2021_10/2021-010.pdf?ga=1 [2022-10-19]
- Sundquist, B. (1981). Goat visna virus: Isolation of a retrovirus related to visna virus of sheep. *Archives of Virology*, 68 (2), 115–127. <https://doi.org/10.1007/BF01314441>
- Torelli, A., Gianhecchi, E., Monti, M., Piu, P., Barneschi, I., Bonifazi, C., Coluccio, R., Ganfini, L., La Magra, L.M., Marconi, S., Marzucchi, G., Pace, R., Palladino, L., Biagi, B. & Montomoli, E. (2021). Effect of repeated freeze–thaw cycles on influenza virus antibodies. *Vaccines*, 9 (3), 267. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030267>
- Torsteinsdóttir, S., Andrésdóttir, V., Arnarson, H. & Petursson, G. (2007). Immune response to maedi-visna virus. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library*, 12, 1532–43. <https://doi.org/10.2741/2166>
- Vesna, P., Neven, A., Mioč, B., Ivanković, A. & Havranek, J. (2002). Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech Journal of Animal Science*, 47
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D.L., King, K. & Nema, S. (2007). Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (1), 1–26. <https://doi.org/10.1002/jps.20727>
- Winnicka, A., Kluciński, W., Hoser, G., Sikora, J. & Kawiak, J. (1999). Flow cytometry analysis of milk and peripheral blood cells from goats during lactation. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 46 (8), 459–464. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.1999.00234.x>

Populärvetenskaplig sammanfattning

I Sverige finns cirka 400 000 får och 20 000 getter och de kan drabbas av en rad olika sjukdomar, precis som vi människor kan göra. Alla får- och getägare har nog någon gång märkt att ett djur blivit sjukt och varit i behov av veterinärvård, ibland kanske det till och med inte gått att rädda djuret till allas besvikelse. Tänk er nu i stället en sjukdom som kan drabba små idisslare där det i slutändan handlar om *när* ett djur kommer att dö och inte om. Två sådana dödliga sjukdomar är maedi-visna (MV) hos får och kaprin artrit encefalit (CAE) hos get. De orsakas av två virus som går under namnen visna-maedivirus (VMV) och kaprin artrit encefalitvirus (CAEV). Dessa virus är nära besläktade och kallas ofta gemensamt för lentivirus hos små idisslare (engelska: small ruminant lentivirus; SRLV). De tillhör dessutom samma grupp virus som HIV. Djur som infekteras av SRLV drabbas av kroniska inflammationer i flertal olika organsystem, likt människor som drabbas av HIV. Får drabbas vanligare av lunginflammation medan getter oftare drabbas av ledinflammationer. Men djuren kan också få juverinflammationer och inflammation i hjärna och ryggmärg. Kliniska tecken som kan ses är bland annat hosta, andnöd, hálta, svullet och ömt juver, vikt-nedgång, abort och de kan även bli paralyserade. Som ni redan har förstått innebär detta ett stort lidande för djuren.

När ett djur blivit infekterat av SRLV kan det aldrig bli fri från infektion eftersom viruset tar sig in i djurets egen arvsmassa och skulle därmed kunna sägas bli ett med djuret. Det finns inte heller någon behandling eller effektivt vaccin i dagsläget som kan skydda djuren från sjukdom. I Sverige och i många andra länder finns i stället frivilliga kontrollprogram som är till för att övervaka och fånga upp sjuka individer i ett tidigt skede. MV/CAE-kontrollprogrammet i Sverige går ut på att en veterinär tar ut blodprover från alla djur över ett års ålder och att blodproverna sedan analyseras och klassificeras som positiva eller negativa. Att ha som inställning att vänta på att ett djur ska bli sjukt för att då provta och se om djuret har viruset är oftast ingen bra idé. Det tar nämligen lång tid innan djuret utvecklar kliniska tecken, och då har viruset ofta spritt sig till hela eller en stor del av besättningen. Trots att SRLV leder till en dödlig utgång för drabbade djur är endast 45 procent av de svenska fåren och 13 procent av de svenska getterna med i kontrollprogrammet. Det skulle kunna bero på de kostnader som anslutning innebär, till exempel kostnaden för provtagning och analysen av prover. I detta arbete har vi därför undersökt

om mjölk skulle fungera lika bra som blod att analysera, vilket skulle leda till en billigare provtagning då djurägare själva kan samla och skicka in prover. Mjölksprover är även snällare mot djuren som slipper bli fasthållna och stuckna i halsblodådern.

I arbetet har vi samlat in ett flertal parade blod- och mjölkprover från får respektive getter och analyserat dessa med en metod som heter ELISA på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). ELISA undersöker om ett djur har antikroppar mot viruset och har djuret antikroppar så anses den som positiv för viruset. Gård & Djurhälsan hade även ett projekt under våren 2022 där fårägare fick skicka in mjölkprover som analyserades på SVA för SRLV-antikroppar. En del av dessa djur har även ingått i denna studie för att undersöka om laktationsperioden kan påverka mängden antikroppar och när det i så fall är lämpligt att samla in mjölkprover från djuren. För att minska kostnadsanalysen har poolning även undersökts. Poolning innebär att man blandar flera prover från olika djur och analyserar dessa samtidigt.

Om mjölk visar sig kunna ersätta blod kommer det troligtvis resultera i att mjölkprover kommer förvaras i frys en viss tid för att djurägare ska kunna skicka alla prover samtidigt. Om det är ett litet antal prover som skickas kommer även mjölkproverna förvaras i frys på labbet för att invänta ett större antal prover så att labbet kan spara tid genom att analysera flera prover samtidigt. Blodprover brukar även sparas i frys en viss tid efter analys och det kan bli aktuellt även för mjölkprover om dessa ska ersätta blodproverna. Vi har därför undersökt om frysning påverkar antikropparna i mjölkproverna. Ytterligare en frågeställning som vi har undersökt är vilken ELISA som är mest lämplig för analys: ID Screen ELISA eller Elitest ELISA. Dessa två fungerar på liknande sätt men de har olika tillverkare och skiljer sig något åt i instruktionerna.

Vi kom fram till att mjölkprover kan bli aktuellt i kontrollprogrammet, eftersom resultatet för mjölk och blod stämde bra överens. Det krävs dock fler studier på detta eftersom alla fåren i studien var negativa för SRLV och analysen behöver utvärderas för positiva prover också. Bland getterna fanns det positiva individer och de hade också en bra överensstämmelse med sina parade blodprover men i det fallet krävs det fler individer för att dra en säker slutsats. När vi undersökte vid vilken tidpunkt under laktationen det är lämpligt att provta fåren kom vi fram till att det kan vara fördelaktigt att följa upp positiva mjölkprover från tidig laktation med en provtagning senare i laktationen för att undvika falskt positiva svar. Råmjölk kan nämligen innehålla mycket fett som stör analysen. Hur antikroppsmängden varierade under laktationsperioden kan vi inte besvara eftersom fårens mjölkprover var negativa och getterna endast blev provtagna en gång under sin laktationsperiod. Det vore intressant att undersöka detta vidare för att komma fram till när i

laktationen det är mest lämpligt att samla mjölkprover oberoende av om det rör sig om positiva eller negativa djur.

När vi poolade getmjölken kunde den individ med mest antikroppar spädas till en koncentration på 1:128, vilket motsvarar en del positiv mjölk och 127 delar negativ mjölk. Detta är lovande för att eventuellt kunna få ned analyskostnaderna ytterligare genom att blanda mjölkprover från flera djur. Resultatet från frysningen tyder på att antikroppsmängden påverkas av frysning efter att fyra år har passerat, i alla fall när Elitest ELISA användas som analysmetod. När vi i stället testade att använda ID Screen ELISA var den mycket bättre på att detektera de positiva mjölkproverna och anses därmed som en bättre analysmetod.

Vi hoppas att detta arbete ska leda till fler studier kring ämnet och till slut kanske det blir en självklarhet att använda mjölk i stället för blod för att analysera för lentivirus hos små idisslare. Detta skulle vara billigare för djurägare och en snällare provtagningsmetod för djuren. Vår förhoppning är att detta ska leda till att fler djurägare väljer att ansluta sin besättning till kontrollprogrammet så att vi inom en snar framtid kan utrota lentivirus hos små idisslare helt och hållet.

Tack

Jag vill rikta ett stort tack till mina handledare Jonas Johansson Wensman, Jenny Frössling och Anna Ordell för deras stöd och engagemang under arbetets gång, samt min examiner Ylva Persson som har kommit med värdefulla kommentarer och snabba svar. Jag vill även tacka all laboratoriepersonal på SLU och SVA, särskilt Viktor Ahlberg, Sofia Wallgren och Gabriella Hallbrink Ågren, som har hjälpt mig med det laborativa arbetet.

Jag vill även utfärda ett varmt tack till Stiftelsen Elsa Paulssons minnesfond som bistod mig med ett generöst stipendium så att jag skulle ha möjlighet att utföra de gårdsbesök och provtagningar som ingått i arbetet. Jag vill även tacka Formas (2021-02286) som även de har bistått ekonomiskt, och som även kommer att fortsätta bidra till doktorandprojektet om små idisslares lentivirus.

Jag vill tacka alla djurägare och djur som har ställt upp i mitt arbete. Ni har visat mig stor gästvänlighet och utan er skulle inte detta arbete ha kunnat utföras. Sist men inte minst vill jag tacka min familj och min goda vän och kurskamrat Yrsa Helmer som har peppat mig under processen.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. **Som student äger du upphovsrätten** till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.