



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Prevalens av stor leverflundra (*Fasciola hepatica*) bland mjölkbesättningar i Sverige, påvisad genom detektion av antikroppar i tankmjölk

Malin Djerv

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:12*

Prevalens av stor leverflundra (*Fasciola hepatica*) bland mjölkbesättningar i Sverige, påvisad genom detektion av antikroppar i tankmjölk

Malin Djerv

Handledare: Johan Höglund, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF), sektionen för parasitologi

Examinator: Anna Lunden, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF), sektionen för parasitologi

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Fasciola hepatica, leverflundra, prevalens, tankmjölk, Sverige, nötkreatur, serologi

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
LITTERATURÖVERSIKT	3
<i>Fasciola hepatica</i>	3
Livscykel	3
Epidemiologi	4
Sjukdom	4
Behandling och profylax	5
Diagnostiska metoder	6
Detektion av ägg i träck	7
Detektion av antikroppar i serum	7
Detektion av antikroppar i mjölk	8
Detektion av antigen i träck	8
Inspektion vid slakt eller obduktion	9
Produktionspåverkan	9
Prevalens i Europa	10
Klimatpåverkan	12
MATERIAL OCH METOD	14
ELISA	14
RESULTAT	15
Prevalens	15
Utbredning besättningar	16
Mjölkproduktion	18
DISKUSSION	19
ERKÄNNANDE	21
LITTERATURFÖRTECKNING	22

SAMMANFATTNING

Fasciola hepatica tillhör klassen trematoder och är spridd över hela världen. Dess värddjur är framför allt nötkreatur och får. I parasitens livscykel ingår även en mellanvärd i form av den amfibiska dammsnäckan, *Galba truncatula* (Urquhart *et al* 1996). Parasiten angriper huvudvärdens lever, vilket hos nötkreatur oftast leder till en kronisk infektion med produktionsnedsättning (Salimi-Bejestani *et al* 2008).

Hos nötkreatur har förekomsten av *F. hepatica* de senaste åren ökat i många länder, till exempel i England och Wales (Salimi-Bejestani *et al* 2005). Troligen beror ökningen delvis på att nötkreatur i större utsträckning betar naturområden med sankmarker. I fuktiga markområden finns goda habitat för mellanvärderna (Albihn *et al* 2008). Mellanvärderna gynnas även av varmt och regnigt väder, vilket pågående klimatförändringar leder till. Detta kan i sin tur ge en ökning av *F. hepatica* (Pritchard *et al* 2005). Svenska slakterier rapporterade under 2007 att 3 % (Hegrestad 2008) och under 2008 att 5 % (Dimander 2009) av korna hade leverar som otjänligförklarades på grund av *F. hepatica*.

Syfte med den här studien var att bestämma prevalensen av *F. hepatica* bland svenska mjölkbesättningar, genom att påvisa antikroppar i tankmjölk. Tankmjölksprover samlades in från svenska mjölkbesättningar i augusti 2005 och 2006. Av dessa undersöktes 538 prover med hjälp av en kommersiellt tillgänglig ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) från Institut Pourquier i Frankrike (Pourquier®ELISA Bovine Fasciolosis serum and milk verification). Det visade sig att sju besättningar hade antikropps nivåer över det av tillverkaren fastställda gränsvärdet, vilket tyder på infektion av *F. hepatica*. Detta medför en prevalens på 1,3 % bland de svenska mjölkbesättningarna. De positiva besättningarna var lokaliserade i sydvästra delen av landet.

De positiva besättningarnas placering var förväntad, eftersom högst frekvens slaktanmärkningar på leverar från nötkreatur även finns i detta område (Dimander 2009). Den uppmätta prevalensen i studien var dock något lägre än förväntat. Detta kan bero på att tankmjölkproverna var insamlade vid en icke optimal provtagningstidpunkt för analys av leverflundra. Studier visar även att minst 60 % av djuren i besättningen måste vara infekterade för att ge ett positivt utslag i ELISAn (Reichel *et al* 2005). Sverige har dock oavsett detta än så länge en relativt låg förekomst av *F. hepatica*, i jämförelse med flera andra länder i vårt närområde.

SUMMARY

Fasciola hepatica belongs to the class Trematoda and has a worldwide distribution. The main final hosts are cattle and sheep. To complete its life cycle *F. hepatica* needs to infect an intermediate host, the snail *Galba truncatula* (Urquhart *et al* 1996). The adult parasites are found in the liver of their host. Most often cattle are chronically infected, which may result in losses in milk production (Salimi-Bejestani *et al* 2008).

In many countries the occurrence of *F. hepatica* infection is rising among cattle, for instance in England and Wales (Salimi-Bejestani *et al* 2005). The higher prevalence is associated with cattle grazing in wetter grasslands. Wet pastures are suitable habitats for the intermediate host and thus favour the parasite (Albihn *et al* 2008). The intermediate host is also favoured by a milder and wetter climate (Pritchard *et al* 2005). Abattoirs in Sweden reported in 2007 that 3 % of their slaughtered cows had livers infected and/or damaged by the liver fluke (Hegrestad 2008). In 2008 the prevalence was 5 % (Dimander 2009).

In this study the prevalence of *F. hepatica* infection in Swedish milk dairy herds, was investigated by measuring specific antibody levels to the parasite in bulk tank milk. The samples were collected in august 2005 and 2006. Altogether 538 bulk tank milk samples were analysed using a commercially available ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) from Institut Pourquier in France (Pourquier@ELISA Bovine Fasciolosis serum and milk verification). Seven herds had antibody levels above the cut of value for infection and only two of these were indicative of a massive infection. The overall seroprevalence of *F. hepatica* in Swedish dairy herds was 1.3 %. The positive herds were located in the south west of the country.

The locations of the positive herds were expected, since livers infected with *F. hepatica* from cattle is also more common in abattoirs in this region. However, the seroprevalence was somewhat lower than expected. This can be a consequence of a non-optimal sampling time and/or the fact that at least 60 % of the cows in the afflicted herd needs to be infected in order to be detected by the ELISA used herein. Irrespective of the explanation for the low seroprevalence, dairy herds in Sweden has a relatively low prevalence of *F. hepatica* in comparison with other countries.

Keywords: *Fasciola hepatica*, liver fluke, prevalence, bulk tank milk, Sweden, dairy herd, cattle, serology

INLEDNING

Fasciola hepatica är en parasit på frammarsch. Dess förekomst i Västeuropa hos nötkreatur ökar, till exempel i länder som England och Wales (Salimi-Bejestani *et al* 2005). I Sverige uppskattas idag förekomsten av parasiten utifrån antalet slakthanmärkningarna på nötkreaturens lever. I mjölkbesättningar finns nu även möjlighet att påvisa *F. hepatica* genom att i tankmjölken detektera specifika antikroppar riktade mot parasiten.

I denna studie var syftet att bestämma prevalensen av *F. hepatica* hos svenska mjölkbesättningar, genom att påvisa antikroppar i tankmjölken. Detta genomfördes med hjälp av en kommersiellt tillgänglig ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) från företaget Institut Pourquier i Frankrike.

De antikroppspositiva besättningarnas geografiska placering i landet lokaliserades, för att kunna identifiera eventuella problemområden. Enligt anmärkningar vid slakt borde de antikroppspositiva gårdarna finnas i Västsverige (Dimander 2009).

Rapporten inleds av en genomgång av utvald litteratur över bland annat parasitens livscykel och epidemiologi. Texten berör också diagnostiska metoder, förekomst av *F. hepatica* i andra länder och hur parasiten påverkas av de pågående klimatförändringarna. En av anledningarna till att *F. hepatica* ökar sägs nämligen vara det mildare och fuktigare klimatet (Pritchard *et al* 2005).

LITTERATURÖVERSIKT

Fasciola hepatica

Det svenska namnet på *Fasciola hepatica* är stor leverflundra, som är en trematod (sugmask) tillhörande familjen Fasciolidae. Parasiten är tillplattad dorsoventralt och har två sugkoppar, varav en är ventralt placerad och en finns kring munnen. De inre organen är inpackade i ett parenkym i avsaknad av en egentlig kroppshåla och tarmsystemet slutar blint. Födan består av blod och vävnadsdebris. De könsmogna parasiterna är hermafroditer, men trots detta sker befruktning alltid mellan två individer. *F. hepatica* är spridd över hela världen och har framförallt får och nöt som huvudvärd. Parasiten är dock en generalist och flera däggdjur som exempelvis häst, gris och människa kan infekteras, även om detta endast sker sällsynt och företrädesvis i utvecklingsländer. Livscykeln är indirekt med en landlevande snäcka som mellanvärd. Parasitens mellanvärd i Europa är framförallt den amfibiska dammsnäcka, *Galba truncatula* (Urquhart *et al* 1996).

Livscykel

Fasciola hepatica har en indirekt livscykel på minst 17 veckor. Parasitens ägg utskiljs med värdjurets avföring. Ur ägget kommer ett första larvstadium, en miracidium, som inom tre timmar måste hitta sin mellanvärd. Inuti dammsnäckans matsmältningskörtel uppföras parasiten asexuellt via en sporocyst- och en rediregeneration till hundratals cercarier. Dessa tar sig ut ur snäckan och fäster till den omkringliggande vegetationen, samt omvandlas till invasiva metacercarier. Utvecklingen utanför huvudvärden från miracidium till metacercarie tar minst 6-7

veckor. En miracidium ger på detta vis upphov till över 600 metacerkarier (Urquhart *et al* 1996).

När metacerkarien äts upp av huvudvärden penetrerar den tarmväggen i övre delen av tunntarmen. Leverkapseln genomträngs varefter larverna först tillbringar 6-8 veckor i leverparenkymet. Fullvuxna *F. hepatica* påträffas i gallgångarna. Parasiten kan överleva i knappt ett år hos nötkreatur. Prepatensperioden, dvs tiden från det att huvudvärden blir infekterad tills parasitens ägg börjar utsöndras, är cirka 10-12 veckor (Urquhart *et al* 1996).

Epidemiologi

Antalet *Fasciola hepatica* i ett område påverkas av temperatur och fuktighet, men även av lämpliga habitat för parasitens mellanvärd. Dammsnäckorna lever i diken, bäckar och kärr samt tillfälliga vattensamlingar (Urquhart *et al* 1996). I stillastående vattendrag kan miracidie-larven lättare hitta snäckorna, vilket ökar risken för att huvudvärdar som betar nära vattnet smittas (Schweizer *et al* 2007). Dammsnäckans fortplantning och utvecklingen av *F. hepatica* inuti snäckan kräver dock en dygnsmedeltemperatur som överstiger +10°C. En högre prevalens *F. hepatica* hos idisslare ses följaktligen efter en betesperiod med varma och fuktiga förhållanden (Urquhart *et al* 1996).

Parasiten överlever vintern till nästa betessäsong antingen inuti dammsnäckorna, som metacerkarier på betet, eller som vuxna parasiter inuti huvudvärden. Övervintrande metacerkarier på betet kan smitta betesdjur redan när de släpps ut på våren. Dessa nötkreatur börjar utsöndra en ny generation ägg under högsommaren, vilket gradvis leder till att smittan ökar på betet mot slutet av betessäsongen. Parasiter som övervintrat inuti huvudvärden utskiljer ägg med träcken på våren. Dessa ägg utvecklas sedan via mellanvärden och blir infektiösa metacerkarier under sensommaren och hösten (Urquhart *et al* 1996).

Sjukdom

Parasitens migration genom leverparenkymet och den inflammation som efterföljer ger skador på levern. Den skadade vävnaden blir fibrös och förkalkas hos nötkreaturen (Sánchez-Andrade *et al* 2002). Klinisk sjukdom uppträder framför allt hos kalvar och ungdjur och ses i allmänhet 4-5 månader efter att de infekterats. Sjukligheten beror i första hand på blodbrist (anemi) och hypoalbuminemi, dvs sänkta nivåer av albumin i blodet vars viktigaste funktion är att upprätthålla det osmotiska trycket i blodkärlen (Urquhart *et al* 1996). Risk finns även att *F. hepatica* penetrerar stora blodkärl i levern, vilket kan ge kraftiga inre blödningar (Mitchell 2002). Även ospecifika symptom som diarré, peritonit, fotosensibilitet och ketos kan ses (Schweizer *et al* 2005).

I Sverige drabbas nötkreaturen framförallt av subklinisk sjukdom, som oftast inträffar under senvintern eller tidig vår (Hegrestad 2008). Infektion med *F. hepatica* kan leda till minskad mjölkproduktion och nedsatt tillväxt. Hur kraftigt djuren påverkas beror på antalet etablerade parasiter i levern (Salimi-Bejestani *et al* 2008). Negativa effekter på produktionen anses framför allt bero både på de omogna leverflundrornas migration genom leverparenkymet och på de vuxna leverflundrornas aktivitet i gallgångarna (Charlier *et al* 2007).

Behandling och profylax

I Sverige utförs sällan behandling mot *Fasciola hepatica* hos nötkreatur. Kraftigt infekterade ungdjur, med dålig tillväxt vid installning, eller dikor i nedsatt kondition på hösten behandlas om behov föreligger (Hegrestad 2008). Behandling kan utföras med bland annat triclabendazol eller albendazol, som båda tillhör substansgruppen bensimidazoler. Triclabendazol avdödar, till skillnad från albendazol, både parasitens omogna och mogna levnadsstadier. Det krävs alltså riktad behandling mot *F. hepatica*, utöver den vanliga avmaskningen mot gastrointestinala nematoder (Mitchell 2002). Långa karenstider efter behandling med avmaskningsmedel mot *F. hepatica* gör att mjölkkor främst behandlas under sintid. Behandlingen utförs ofta därför inte med optimala intervall eller under rätt säsong (Schweizer *et al* 2005).

Resistens mot triclabendazol hos *F. hepatica* har rapporterats i flera länder. Bland annat har en studie utförd i Nederländerna påvisat behandlingssvikt bland nötkreatur med leverflundrainfektion, vilket indikerar resistens hos parasiten (Moll *et al* 2000). Detta antas bero på att nötkreatur blivit infekterade med resistent leverflundror från får. Triclabendazol används regelbundet till får och de sambetar ibland med nötkreatur. Omfattningen av resistensproblematiken hos *F. hepatica* är dock ännu ej helt klarlagd (Moll *et al* 2000). Det saknas exempelvis dylika studier från både Sverige och våra grannländer.

Profylaktisk beteshygieniska åtgärder, kan precis som hos övriga betesparasiter, bidra till att förebygga infektion och därmed minska parasitbördan hos djuren. Exempelvis bör vattensjuka betesmarker undvikas, vilket kan ske genom att stängsla av eller dränera områden där mellanvärden trivs. Gräsytorna bör inte heller betas för hårt, eftersom det tvingar djuren till sankare områden på betet. De vattensjuka partierna ska framför allt inte betas på sensommaren och hösten. Växel- eller sambete med får är som redan antytts ej att rekommendera i detta fall, eftersom *F. hepatica* även angriper får. Förebyggande beteshygieniska åtgärder, som exempelvis dränering av sankmarker, försvåras också i vissa fall av naturvårdskrav (Hegrestad 2008).

Idag saknas kommersiellt framställda vaccin mot *F. hepatica*. Fördelen med vaccination är att det kan ges som ett förebyggande skydd mot infektionen. Behandling med avmaskningsmedel har däremot endast effekt på de parasiter som finns hos värdjuret vid behandlingstillfället. Studier utförs för närvarande med vacciner baserade både på nativa proteiner och med rekombinanta proteiner framställda ur DNA från *F. hepatica*. Kandidater för vaccin är bland annat cystein-proteaserna cathepsin L och B, glutathione S-transferase, leucine aminpepsidase och fettsyra-bindande proteiner (Dalton *et al* 2003).

Den mest undersökta kandidaten är cathepsin L, vilket är ett ämne som utsöndras med parasitens exkretions- och sekretionsprodukter. Cathepsin ingår i många för parasiten livsviktiga processer, däribland dess födointag, invasion och migration av vävnad samt att undvika värdjurets immunförsvar (Dalton *et al* 2003). Cathepsin L finns i olika former hos alla parasitens utvecklingsstadier, medan cathepsin B finns framför allt hos de omogna larverna (Jayaraj *et al* 2009). Det är främst de omogna larverna som skadar värdjurets lever, varför ett vaccin i första

hand bör skydda mot dessa. Studier hos råttor har visat att vacciner som kombinerar cathepsin L och B ger ett bättre skydd än när de enskilda komponenterna används var för sig. Kombinationer av antigen som täcker in olika utvecklingsstadier hos parasiten kan ha en fördel, i jämförelse med vaccin som enbart innehåller antigen från vuxna parasiter (Jayaraj *et al* 2009). Vaccinationsstudier med cathepsiner har dock gett skiftande resultat vad gäller det skydd mot infektion som framkallas. De studier som finns är dock svåra att jämföra eftersom de skiljer sig vad gäller vaccinernas sammansättning, dos och administrationssätt. Vissa undersökningar visar dock att parasiternas utveckling till vuxet stadium hämmas hos vaccinerade individer, vilket i sin tur ger färre leverskador. Hos de vuxna parasiterna är det också färre som producerar viabla ägg. Förhoppningen är att vaccination på sikt ska leda till minskad kontamination av beten och därmed hejda smittan (Dalton *et al* 2003).

Idag har den genetiska sammansättningen hos många parasitarter kartlagts, vilket förväntas leda till framtida framsteg vad gäller diagnos och kontroll av de sjukdomarna som de orsakar. Den genetiska informationen anses exempelvis kunna användas för att utveckla vaccin. Inte bara generna utan även de funktionella proteiner, som de kodar för, måste dock först identifieras. Till DNA-vaccin används exempelvis cDNA (komplementärt DNA). cDNA bildas när enzymet omvänt transkriptas katalyserar en reaktion där RNA används som substrat för att ta fram den motsvarande DNA-kopian. Det finns exempelvis cDNA som kodar för proteinerna cathepsin L framtaget. Vid DNA-vaccination för man in en så kallad expressionsvektor vars uppgift är att uttrycka cDNA för det specifika antigen som ska stimulera utvecklingen av ett skyddande immunförsvar hos de vaccinerade djuren. Vaccinationsstudier med cDNA hos råttor, infekterade med leverflundror, visade att parasitbördan hos de vaccinerade individerna var lägre än hos de ovaccinerade. Antalet parasiter i levern hos de vaccinerade hanråttorna var 74 % lägre än hos de ovaccinerade. Ingen av de vaccinerade hanråttorna hade parasiter i levern, 7 veckor efter infektionstillfället. Det är dock fortfarande lång väg kvar innan det finns ett fungerande vaccin mot leverflundra hos nötkreatur (Kofta *et al* 2000).

Diagnostiska metoder

Diagnosen fasciolos kan vara svår att ställa på det levande djuret. Den kan dock ställas genom att påvisa parasitens ägg i träck. Även antikroppar riktade mot leverflundran kan identifieras i serum eller mjölk med hjälp av ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay (Salimi-Bejestani *et al* 2005). Dessutom finns det ELISA-tester för detektion av antigen i serum och träck (Charlier *et al* 2007). I tillägg kan klinisk kemisk undersökning av leverenzym, som aspartat aminotransferase (ASAT) och glutamat dehydrogenase (GLDH), utföras. Dessa enzymer ger utslag två till tre veckor efter infektionen. Nackdelen är dock att mätvärdena är ospecifika och endast indikera att levern är skadad (Mitchell 2002). Ledtrådar som säsong, väderförhållanden, förekomst av snäckhabitat och tidigare sjukdomshistoria i besättningen är också till hjälp (Urquhart *et al* 1996).

Detektion av ägg i träck

I träck räknas antalet ägg från *F. hepatica*. Nackdelen med äggräkning är att infektionen kan upptäckas först cirka 10 veckor efter smittotillfället. Det spelar därför stor roll när träckprovet tas (Reichel et al 2005). Dessutom kan endast djur med vuxna leverflundror identifieras med denna metod. Det missas även många infekterade djur på grund av att äggen utskiljs intermittent och i ringa mängd. Upprepade träckprovsundersökningar är därför nödvändigt (Hutchinson 2003).

Tester för identifikation av ägg i träck har dessutom en låg sensitivitet, ner mot 30 %, vilket leder till underdiagnostik med många falskt negativa provsvar (Happich och Boray 1969). En sedimentationstest med 10 g träck utförd av Rapsch med flera (2006) hade dock en sensitivitet på 69 %, vid jämförelse med inspektion av leverar vid slakt. Upprepad undersökning av träckprover ökar testens sensitivitet, men större träckmängder och undersökning av flera prover blir dock mer arbetskrävande.

Mängden detekterade ägg går ej alltid att relatera till djurets infektionsbörda. Med ett litet prov på 4 g träck upptäcks endast sådana individer med en kraftig infektion. Provtagningen bör helst ske under vintern eller tidig vår, eftersom det är då djuren bär på störst antal fullvuxna parasiter (Charlier et al 2008).

Detektion av antikroppar i serum

Under parasitens migration i leverparenkymet exponeras huvudvärden för *F. hepatica*-antigen varvid en produktion av antikroppar stimuleras (Sánchez-Andrade et al 2002). Nivån av dessa antikroppar kan mätas i serum med hjälp av olika ELISA-tekniker. Nackdelen med serumprover är att de måste tas individuellt från varje djur. Antikroppstester identifierar också både djur med en pågående infektion och med en avslutad infektion, då antikropparna finns kvar upp till flera månader efter avslutad infektion (Salimi-Bejestani et al 2005). Efter behandling med triclabendazol kvarstår antikropparna upp mot 6-7 månader hos nötkreaturet, även om djuret inte reinfekteras (Castro et al 2000).

Det franska företaget Institut Pourquier har tagit fram en kommersiellt tillgänglig ELISA test för detektion av antikroppar såväl i serum som i mjölk (Pourquier®ELISA Bovine Fasciolosis serum and milk verification). Testen bygger på ett så kallat f2-antigen och där antikroppar kan upptäckas från två veckor efter infektionens början. Efter cirka åtta veckor nås toppkoncentration av antikroppar. Testen kan användas både för grupper av djur och för enskilda individer (Hutchinson 2003).

En studie har, med hjälp av detektion av ägg i träckprover, kommit fram till att sannolikheten att Institut Pourquiers ELISA för serum korrekt identifierar individer som är sjuka ligger på 98 %, alltså testens sensitivitet. Samma studie påvisade en specificitet, dvs sannolikheten att testen korrekt identifierar individer som är friska, på 98 % (Molloy et al 2005). En annan utvärdering visade en sensitivitet på 92 % hos ELISAn, med en specificitet på 94 %, i förhållande till detektion av ägg i träckprover (Rapsch et al 2006). Tillverkarnas tröskelvärde för negativa respektive positiva prover ($S/P \geq 30$ %) stämmer bra för både individuella serum- och mjölkprover (Reichel et al 2005; Molloy et al 2005).

Provtagning vad gäller detektion av pågående leverflundreinfection bör i första hand ske under vintern, eftersom den största infektionsdosen fås under hösten. Parasiten har vintertid utvecklats till vuxet stadium och därmed framkallat ett antikroppssvar hos värdjuret (Salimi-Bejestani *et al* 2005).

Det finns studier som visar på att antikropps nivåerna i serum kan användas för att bedöma hur kraftigt nötkreaturet är infekterat av *F. hepatica* (Salimi-Bejestani *et al* 2008). Andra studier motsäger dock ett sådant samband (Reichel 2002; Charlier *et al* 2008), vilket inte är så konstigt då värdjurets antikroppssvar beror på flera faktorer, som exempelvis hur individens immunförsvar reagerar, hur länge det varit utsatt för smitta, samt eventuell behandling med avmaskningsmedel (Salimi-Bejestani *et al* 2008).

Detektion av antikroppar i mjölk

Detektion av antikroppar i mjölkprover kan göras antingen på individnivå genom undersökning av enstaka prover eller på besättningsnivå med tankmjölksprover. Med prover på tankmjölken är det möjligt att på ett enkelt och kostnadseffektivt sätt uppskatta prevalensen av *F. hepatica* inom ett bestämt geografiskt område. Beroende på resultatet kan sedan åtgärder sättas in, vilket framförallt är aktuellt i områden med kraftigt infekterade besättningar (Salimi-Bejestani *et al* 2005).

ELISAn producerad av Institut Pourquier kan som redan antytts användas både vid analys av serum och av mjölk. Vid undersökning av samlingsprover av serum, från minst 20 individer, är det möjligt att identifiera positiva besättningar om prevalensen är $\geq 5\%$. När det gäller samlingsprover av mjölk måste dock prevalensen vara $\geq 60\%$ inom besättningen, för att det ska ge utslag på testresultatet som en positiv besättning (Reichel *et al* 2005). Enligt manualen till Institut Pourquiers ELISA kan dock även besättningar med en lägre prevalens än 60% upptäckas vid undersökning av tankmjölkprover (Institut Pourquier 2008). Antikropps nivåer i individuella mjölkprover har god överensstämmelse med motsvarande antikropps nivåer i serum. ELISA-resultat baserade på individuella mjölkprover är därför ett fullgott alternativ till resultat från serum (Salimi-Bejestani *et al* 2007).

Institut Pourquiers ELISA hade på utspädda individuella mjölkprover en sensitivitet på 95% och specificitet på 98%, vid en jämförelse med antikropps nivåerna i individuella serumprover (Reichel *et al* 2005). Sensitiviteten hos ELISAn sjönk sedan, i jämförelse med serumprover, när mjölkproverna spädades. Spädning av mjölken upp till 4 gånger minskade gradvis möjligheten att påvisa infektion (Reichel *et al* 2005). Individens laktationsstadium påverkar troligen inte i någon större utsträckning antikroppsmätningen (Salimi-Bejestani *et al* 2007).

Detektion av antigen i träck

Antigen från *Fasciola hepatica* kan detekteras i det infekterade djurets träck. Det finns studier som visar på ett linjärt samband mellan antigenskonsentrationen i träck och antalet *F. hepatica* i värdjurets lever. Med denna test är det alltså möjligt att både identifiera smittade djur, samtidigt som den ger ett mått på hur kraftigt infektionen är (Charlier *et al* 2008).

Det finns minst en kommersiellt tillgänglig ELISA för detektion av antigen i träck, exempelvis från Bio-X Diagnostics, Belgien. Testet består av en indirekt ELISA, med specifika antikroppar riktade mot *F. hepatica* som binder antigenet (Bio-X Diagnostics 2008). Sensitiviteten för denna ELISA, vid en jämförelse med förekomsten av parasiter i levern i samband med slakt, är 94 % och med en specificitet på 93 % (Charlier *et al* 2008). Fördelen med denna ELISA är att antigenet kan identifieras i de infekterade nötkreaturens avföring även när parasiten inte lägger ägg och till skillnad från den serologiska testen, identifieras bara de djur som är infekterade vid det aktuella testtillfället.

Inspektion vid slakt eller obduktion

Diagnos kan naturligtvis även ställas vid inspektion av värdjurets lever i samband med slakt eller vid obduktion. Vuxna *F. hepatica* återfinns i gallgångarna och är synliga för blotta ögat. Parasitens vandring genom levern efterlämnar även makroskopiskt synliga bindvävsärr (Hegrestad 2008). På svenska slakterier inspekteras alla levrar från nötkreatur för dylika patologiska förändringar. Hittas leverflundror eller skador efter dessa i levern sker ett lokalt otjänligförklarande av levern (Sveide 2003).

Vid en studie utförd på slakterier i Schweiz missades upp mot en tredjedel av de infekterade levrarna. Endast de levrar med en kraftig infektion upptäcktes (Rapsch *et al* 2006). Diagnostiken kan dock förbättras genom att skära sönder levern i mindre bitar för att på så sätt frilägga gallgångar och inspektera dessa närmare för eventuell förekomst av leverflundror. En annan möjlighet är att dränka levern i ett vattenbad, varvid parasiterna flyter ut ur gallgångarna (Charlier *et al* 2008).

Produktionspåverkan

Infektion med *Fasciola hepatica* kan påverka produktionsekonomin för den enskilde lantbrukaren. Exempelvis kan mjölkproduktionen hos höglakterande mjölkkor minska med 5-10 % (Hegrestad 2005). Även fetthinnehållet i mjölken minskar, medan proteininnehållet i allmänhet förblir detsamma som innan infektion. Besättningar med höga antikropps nivåer mot *F. hepatica* har även visat sig ha ett längre kalvningsintervall jämfört med genomsnittet (Charlier *et al* 2007). Otjänligförklaring av levern vid slakt är alltså endast en liten förlust i sammanhanget (Schweizer *et al* 2005).

Förhållandet mellan produktion och värdjurets infektionsmängd är dock inte linjärt, utan även lindriga infektioner kan ge påtagliga ekonomiska förluster (Schweizer *et al* 2005). Ju kraftigare infektion är desto allvarligare blir dock följderna, vilket medför att det är viktigt att framför allt identifiera besättningar med en kraftig infektion (Salimi-Bejestani *et al* 2005). Vid vilken parasitmängd nötkreaturens produktion påverkas är emellertid svårt att avgöra. I rapporter har en prevalens inom besättningen som är >25 % eller där >10 stycken *F. hepatica* finns i levern, föreslagits som gränsvärden för en ekonomisk påverkan (Charlier *et al* 2008). Det har även påvisats ett negativt samband mellan höga antikropps nivåer i mjölken och en nedsatt mjölkproduktion (Charlier *et al* 2007).

Prevalens i Europa

I Sverige hade cirka 5,2 % av korna som slaktades år 2008 anmärkningen stor leverflundra, vilket ledde till otjänligförklarande av levern (Dimander 2009). Under år 2007 var siffran 3 % av de 95 000 kor som slaktades det året (Hegrestad 2008). Stor leverflundra (*Fasciola hepatica*) och liten leverflundra (*Dicrocoelium dendriticum*) har från år 2005 till 2007 gett upphov till ett ökat antal slaktanmärkningar, med sammanlagt 0,3 % hos kor och stutar (Hegrestad 2008). Flest otjänligförklaranden på grund av *F. hepatica* sker i västra Sverige, men skillnaden i förekomst är stor mellan olika besättningar (Dimander 2009).

I England och Wales har också en ökad förekomst av *F. hepatica* noterats. Prevalensen vid slakt i Storbritannien har ökat kraftigt sedan 1970-talet, då den låg kring 21 %, till dagens 30 % (Salimi-Bejestani *et al* 2008). Vid en undersökning av antikroppsförekomst mot *F. hepatica* i tankmjölksprover fastställdes en prevalens på 42 % i England och 86 % i Wales. Dessa prover togs i december, då antikropps nivåerna är som högst (Salimi-Bejestani *et al* 2005). Även antalet kliniska fall har ökat bland nötkreaturen. I East Anglia sågs en ökning av de kliniska fallen framför allt mellan åren 2002 och 2003. Ökningen kopplas samman med den större regnmängden som föll under 2001 till 2002, vilken anses gynna utvecklingen och överlevnaden av såväl parasitens mellanvärd som de infektiösa metacerkarierna på betet. Antalet kliniska fall minskade sedan under 2004, troligen beroende på förebyggande åtgärder som flytt av boskap från fuktiga betena samt riktade avmaskningar. Flera av de drabbade gårdarna hade även får. Det fanns dock endast en tendens till ett statistiskt signifikant samband mellan infektion hos nötkreatur och deras kontakt med får. Vilda djur som exempelvis kanin och hjort tros vara viktiga smittreservoarer för leverflundra hos nötkreatur (Pritchard *et al* 2005).

Förekomsten av *F. hepatica* är oftast inte jämt fördelat över landet, utan förlagd till vissa lokaler. Detta beror till stor del på mellanvärdens specifika krav på sin levnadsmiljö, men även olika lantbrukares skötselrutiner (Bennema *et al* 2009). Exempelvis i Portugal ses en högre prevalens på flacka landområden, som regelbundet översvämmas. Förekomsten av *F. hepatica* är alltså högre hos nötkreatur som vistas på sankar betesmarker (Conceição *et al* 2004). Det är även en högre prevalens hos dammsnäckor som är insamlade från beten med mjölkkor, jämfört med från beten som nyttjas av yngre nötkreatur. Detta antas bero på att mjölkorna bär på parasiter redan vid betessläppet på våren, vilket leder till en högre kontamination av betet jämfört med när markerna betas av oinfekterade djur (Schweizer *et al* 2007).

I tabell 1 och 2 redovisas prevalensen av *F. hepatica* hos nötkreatur i ett antal länder på besättningsnivå respektive individnivå.

Tabell 1. Prevalens av *Fasciola hepatica* bland besättningar

Land	Prevalens besättning	Antal besättningar	Diagnostik (Provtagningsstidpunkt)	Studie
England	42 %	623	Tankmjölksprov antikroppar (dec 2003)	Salimi-Bejestani <i>et al</i> 2005
Wales	86 %	445	Tankmjölksprov antikroppar (dec 2003)	Salimi-Bejestani <i>et al</i> 2005
England, East Anglia	53 %	60	Tankmjölksprov antikroppar (nov 2002 – feb 2003)	Pritchard <i>et al</i> 2005
Belgien, Flanders	37 %	1762	Tankmjölkprov antikroppar (okt - nov 2006)	Bennema <i>et al</i> 2009
Italien södra Apenninerna	11 %	81	Träckprov ägg (juni 1999 – mars 2000)	Cringoli <i>et al</i> 2002

Tabell 2. Prevalens av *Fasciola hepatica* hos nötkreatur

Land	Prevalens individer	Antal undersökta djur	Diagnostik (Provtagningsstidpunkt)	Studie
Italien södra Apenninerna	1,8 %	975	Träckprov ägg (juni 1999 – mars 2000)	Cringoli <i>et al</i> 2002
Irland	65 %	83	Inspektion lever (okt-dec 2002, juli-sep 2003)	Murphy <i>et al</i> 2006
Spanien nordvästra	84 %	1284	Antikroppar serum	Sánchez-Andrade <i>et al</i> 2002
Spanien nordvästra	20 %	1284	Antigen serum	Sánchez-Andrade <i>et al</i> 2002
Schweiz	18 %	1331	Träckprov ägg (maj 2004 – aug 2005)	Rapsch <i>et al</i> 2006
Sverige	3 %	95 000	Inspektion lever (2007)	Hegrestad 2008
Sverige	5,2 %	-	Inspektion lever (2008)	Dimander 2009

Klimatpåverkan

Ett förändrat varmare klimat på jorden påverkar såväl utbredningen, förekomsten som samspelet mellan olika arter. De pågående klimatförändringarna antas därför inverka på *F. hepaticas* livscykel, som är starkt väderberoende. Förekomsten av *F. hepatica* påverkas även av andra faktorer som jordmån, ytvatten, jordfuktighet, vegetation med mera. Omgivningen spelar roll framför allt för de frilevande stadierna, samt förökningen inuti mellanvärderna. Ändrade temperaturer och nederbördsmängder inverkar både på parasiten och dess mellanvärdar vad gäller metabolism, utveckling, utbredning, spridning och överlevnad. *F. hepatica* sprider sig till nya områden när mellanvärderna hittar nya habitat eller när parasiten anpassar sig till nya mellanvärdar (Mas-Coma *et al* 2009).

Som tidigare nämnts krävs en medeltemperatur över +10°C för dammsnäckans fortplantning och för en utveckling av *F. hepatica* inuti snäckan (Rapsch *et al* 2008). Fler cercarier bildas och tar sig ut från snäckan när omgivningstemperaturen ökar (Mas-Coma *et al* 2009). Snabbast utveckling av parasitäggen sker i intervallet 23-30°C. Även de dammsnäckor som fungerar som mellanvärdar tillväxer optimalt vid 22-25°C (Rapsch *et al* 2008).

Vid ökad nederbörd och ändrade avdunstningsmönster bildas nya habitat för mellanvärderna (Mas-Coma *et al* 2009). Nederbörd i form av regn har en positiv inverkan på utvecklingen av både mellanvärderna och *F. hepatica*. Var dammsnäckans habitat är lokaliserade beror framför allt på jordmånen och grundvattennivån i området. Marker kring sjöar anses vara riskområden på grund av den höga grundvattennivån. Regnmängden kan sedan påverka habitatets utbredning (Rapsch *et al* 2008).

Dammsnäckan sprider sig idag till nya områden som tidigare varit för torra (Pritchard *et al* 2005). Exempelvis har *F. hepatica* vidgat sitt utbredningsområde från de västra delarna av Skottland och förekommer sedan år 2002 även i Skottlands östra delar. De östra områdena var tidigare torrare än västra Skottland med ett fuktigare klimat. Idag faller det dock cirka 20 % mer regn i sydöstra Skottland än under 1961. Prevalensen av *F. hepatica* har varit särskilt hög under år med mycket regn (år 2000 och 2003) (Kenyon *et al* 2009).

I Eiderstedt, i norra Tyskland, minskade prevalensen av *F. hepatica* under 1970-talet hos nötkreatur som betade strandängar, efter dränering av betesmarkerna och riktad avmaskning. År 1992 var prevalensen hos nötkreatur i området endast 0,005 %, jämfört med 80 % år 1969. Idag har värdet av våtmarker omvärderats (Kemper *et al* 2009). Fuktiga gräsmarker med ansamlingar av ytvatten bevaras i ökad utsträckning och restaureras för att främja den biologiska mångfalden av olika växter, fåglar och insekter (Pritchard *et al* 2005). Detta sker idag även i Eiderstedt. Där förmodas antalet infekterade nötkreatur öka när djuren tillåts beta dessa marker. En undersökning utförd i Eiderstedt efter våtmarksrestaureringen kunde dock inte påvisa någon ökning av leverflundran (Kemper *et al* 2009). Riktad avmaskning mot *F. hepatica* utfördes dock på de gårdar som ingick i studien, vilket enligt författarna eventuellt hindrade en ökande prevalens trots att mellanvärdarna gynnades (Kemper *et al* 2009).

Även i Sverige sker restaurering av våtmarker och strandängar, som i ökad utsträckning utnyttjas som bete (Albihn *et al* 2008). Samtidigt är landet inne i en varmare period (SMHI Klimat 2005). Under 90-talet i Sverige var årsmedeltemperaturen en grad högre än under perioden 1961-1990. Även nederbörden ökade med 8 %. Temperaturen har framförallt ökat vintertid, särskilt i norra och mellersta Sverige. Om detta beror på antropogena klimatförändringar eller om det är ett resultat av naturliga variationer i klimatet är ännu ej fastställt. Väderförhållandena i Sverige uppvisar naturliga variationer från år till år. Samtidigt finns det klimatmodeller som visar att årsmedeltemperaturen i nordnorden troligen kommer att stiga 3-4 grader på hundra år, från 1990 till 2100. Även nederbörden under samma period beräknas öka med 10-15 % (SMHI Klimat 2005). Årsnederbörden i landet är idag 500-800 mm per år, förutom i sydvästra Sverige som får 1000-1200 mm per år (Rossby Centre, SMHI 2007). Liknande klimatscenarion som finns för Sverige finns även för det globala klimatet (SMHI Klimat 2005). Om klimatzonerna förändras kommer utbredningsgränserna för värme- och fuktkrävande arter sannolikt att flyttas norrut (Albihn *et al* 2008). Genom att långsiktigt följa väder och klimat i ett visst område kan förekomsten av *F. hepatica* under ett visst år förutspås (Vercruyse och Claerebout 2001). Det finns även kontrollprogram baserade på vädermodeller utarbetade efter meteorologisk data (Urquhart *et al* 1996).

MATERIAL OCH METOD

Undersökningsmaterialet bestod av tankmjölk från mjölkkobesättningar i hela Sverige. Tankmjölk och besättningsuppgifter från cirka 1000 gårdar samlades in under EU-projektet PARASOL (Novel solutions for the sustainable control of nematodes in ruminants). Proverna var nedfrusna sedan provtagningen, som skedde i augusti 2005 och 2006. Totalt 538 gårdar valdes slumpmässigt ut för undersökning av antikropps förekomst mot *Fasciola hepatica*. Av besättningarna var 198 stycken provtagna år 2005 och 340 stycken år 2006.

ELISA

Analysen utfördes med hjälp av en ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) från Institut Pourquier (Pourquier®ELISA Bovine Fasciolosis serum and milk verification). ELISAn är baserad på ett f2-antigen, som enligt tillverkarna till stor del är specifikt för *F. hepatica* och har en hög immunogenitet. Analysen utfördes efter instruktioner i tillverkarens manual. Två brunnar användes till varje mjölkprov, en brunn med antigen och en brunn utan antigen. Mjölksproverna tillsattes varefter plattan inkuberades. Specifika antikroppar i proverna fäste därvid till f2-antigenet och bildade immunkomplex på brunnens botten. Till brunnarna sattes sedan anti-nöt-IgG-antikroppar konjugerade till enzymet peroxidasa. De konjugerade antikropparna bands till antikropparna från mjölken. När ett enzymsubstrat sedan tillsattes ägde en färgskiftning rum om antikroppar mot *F. hepatica* fanns i mjölkprovet. Den optiska densiteten avlästes vid en våglängd av 450 nm i varje brunn med hjälp av en absorptionsläsare, ThermoLabsystems original Multiskan Ex. På varje platta fanns även en negativ kontroll och två positiva kontroller (Institut Pourquier 2008).

Den optiska densiteten i brunnen med antigen, minus den optiska densiteten i brunnen utan antigen, gav den korrigerade optiska densiteten för mjölkprovet. På liknande sätt togs den korrigerade optiska densiteten fram för den positiva kontrollen (Institut Pourquier 2008).

$$\text{Kvot i procent (S/P)} = \frac{\text{Korrigerad optisk densitet tankmjölkprovet} \times 100}{\text{Korrigerad optisk densitet positiv kontroll}}$$

De avlästa värdena överfördes därefter till Microsoft Excel. Där beräknades S/P (sample/positive) för varje prov. Ett värde på S/P >30 % bedömdes som positivt. Procentsatsen kunde även relateras till i vilken grad besättningarna var infekterade.

S/P ≥ 150 % → kraftig infektion (> 50 % infekterade djur)

80 % < S/P < 150 % → måttlig infektion (20-50 % infekterade djur)

30 % < S/P ≤ 80 % → lindrigt infekterade (< 20 % infekterade djur)

S/P ≤ 30 % → ingen eller mycket lindrig infektion

(Institut Pourquier 2008)

Kartkoordinater till varje besättning fanns tillgängliga och gårdarnas placering i landet kunde därför åskådliggöras på en karta, med hjälp av GIS (geographic information system) i programvaran ArcMap 9.2 (ESRI).

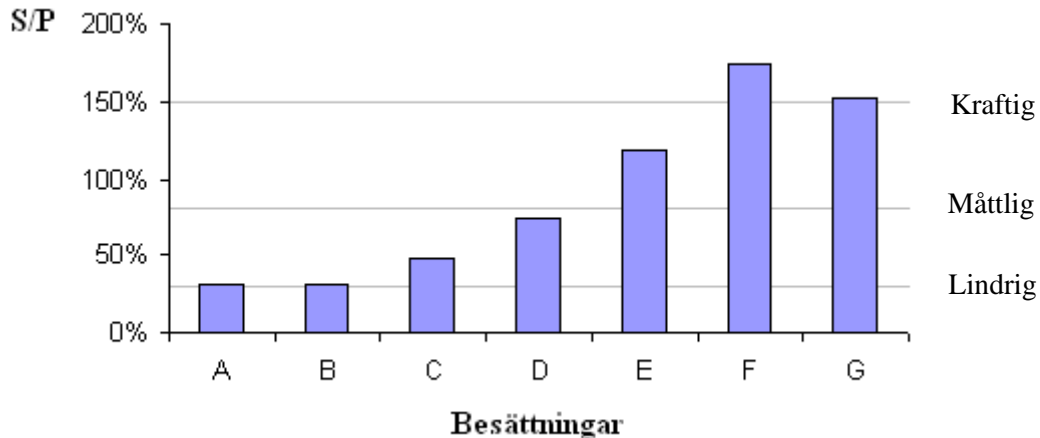
RESULTAT

Prevalens

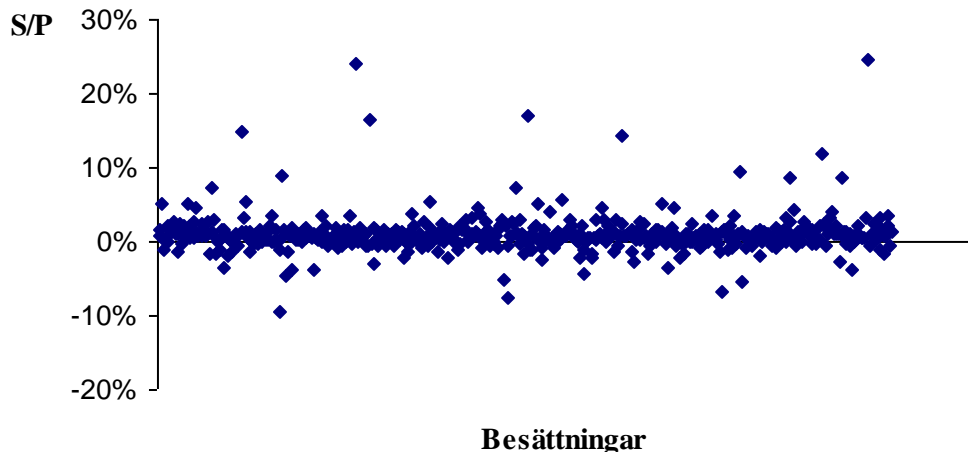
Av 538 undersökta besättningar hade 7 stycken antikropps nivåer över gränsvärdet för infektion. Detta ger en prevalens på 1,3 % bland de undersökta besättningarna. Fyra av besättningarna hade låg förekomst, en hade måttlig förekomst och två hade kraftig förekomst av antikroppar mot *F. hepatica* (figur 1). Av de positiva besättningarna var 5 provtagna under 2006 och de resterande 2 under 2005.

Prevalens = $\frac{\text{Antalet besättningar med infektionen vid en viss tidpunkt}}{\text{Antalet besättningar i populationen vid denna tidpunkt}}$

Flertalet besättningar hade värden under 30 %. Deras resultat kan utläsas ur figur 2. Negativa S/P-tal fås när den optiska densiteten är högre i kontrollbrunnen utan antigen än i brunnen med antigen, vilket tyder på att det inte fanns antikroppar i mjölkprovet som fäst till antigenet.



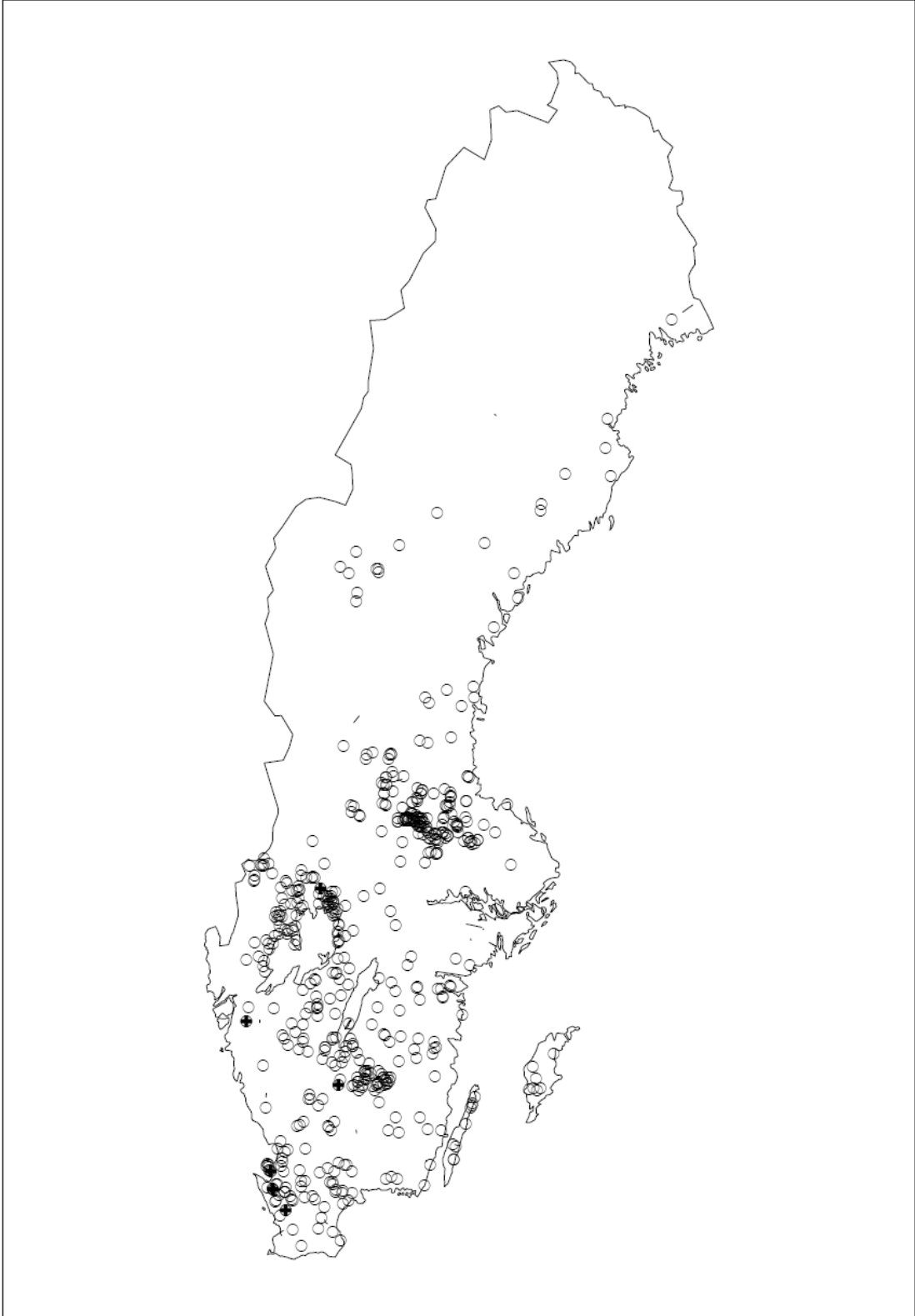
Figur 1. De sju besättningar vars antikropps nivåer låg över gränsvärdet för infektion. Stödlinjerna markerar infektionens allvarlighetsgrad.



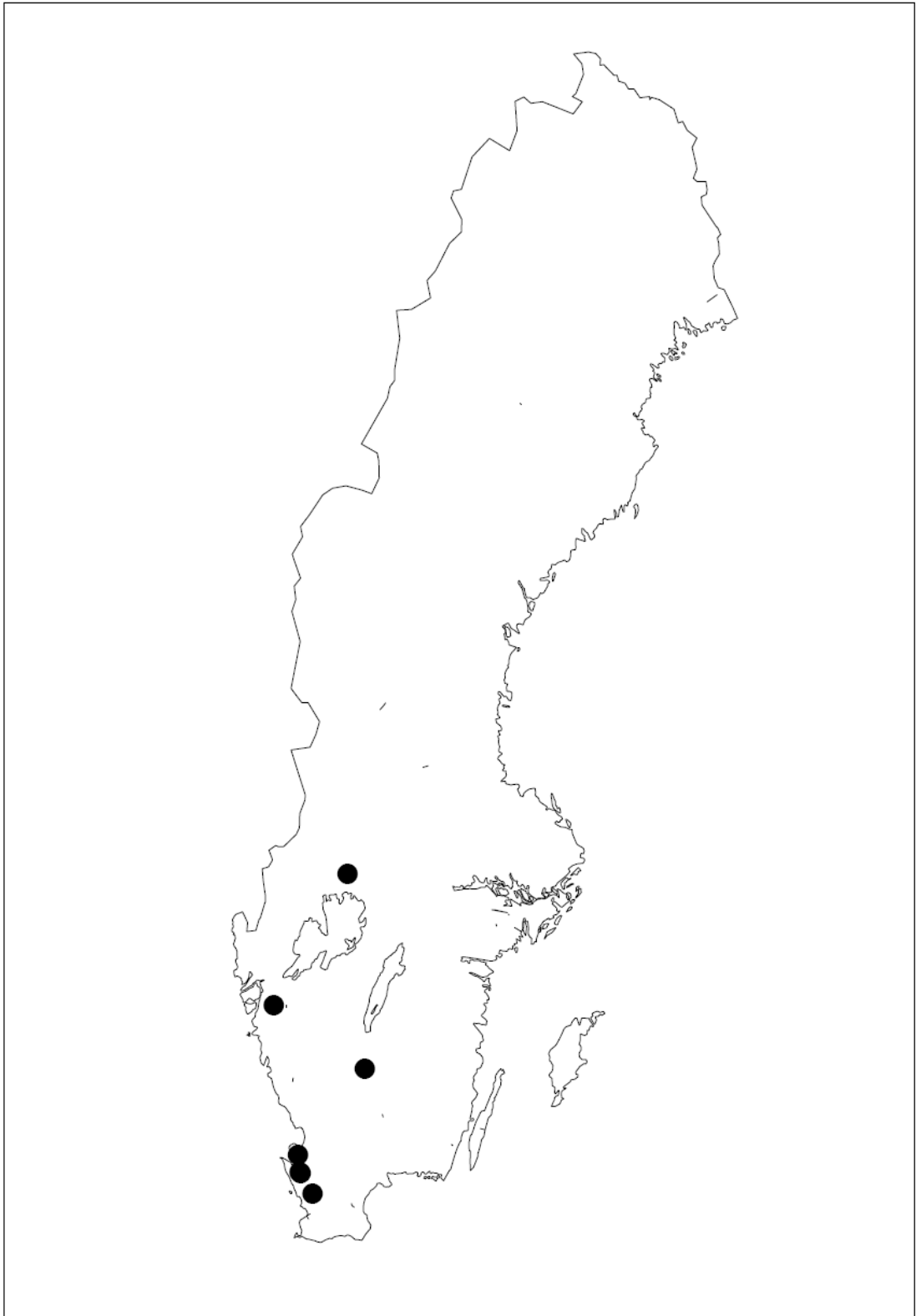
Figur 2. S/P för besättningar vars antikropps nivåer var under gränsvärdet för infektion.

Utbredning besättningar

Var i landet de provtagna besättningarna var lokaliserade framgår av figur 3. Besättningar med antikropps-nivåer över gränsvärdet för infektion är markerade i figur 4.



Figur 3. Alla provtagna besättningsars placering i landet.



*Figur 4. Besättningar med antikropps nivåer över gränsvärdet för infektion med *F. hepatica*.*

Mjolkproduktion

Medeltal på besättningarnas mjolkproduktion per ko och år, uttryckt i kilogram energikorrigerad mjolk (ECM), under de åren mjolkproverna samlades in kan utläsas ur tabell 3. Det fanns ej tillgång till ECM för 16 stycken av de 538 testade besättningarna.

Tabell 3. Medelvärde av den energikorrigerade mjolkproduktionen per ko och år i de undersökta besättningarna under 2005 och 2006.

Besättningar	N antal undersökta prover	Medelvärde kg ECM \pm SD per ko och år
Alla	522	8 667 \pm 1390
Positiva	7	8 888 \pm 1519
Negativa	515	8 664 \pm 1389

Besättningarna med förhöjd förekomst av antikroppar mot *F. hepatica* hade överlag inte en lägre medelproduktion än de övriga besättningarna. En av de lindrigt infekterade besättningarna hade en produktion på 11 750 kg ECM per ko och år. Med den besättningens produktion borträknad blev mjolkproduktionen i medeltal för de andra sex positiva besättningarna 8 410 kg ECM per ko och år.

Svenska mjolkkobesättningar som var anslutna till Svensk Mjolk under 2005 gav i medeltal 9 040 kg mjolk per ko och år, vilket motsvarade 9 254 kg ECM per ko och år. År 2006 var mjolkproduktionen 9 108 kg mjolk per ko och år samt 9 283 kg ECM per ko och år (Svensk Mjolk).

DISKUSSION

Denna undersökning, som omfattade mer än 500 svenska mjölkbesättningar, kom fram till att endast 1,3 % av dessa hade en antikropps förekomst som tyder på en infektion av *F. hepatica*. Endast två av besättningarna var kraftigt infekterade. Detta är en lägre siffra i jämförelse med vad som rapporterats från ett antal andra europeiska länder, som exempelvis Belgien (Bennema *et al* 2009) och England (Salimi-Bejestani *et al* 2005).

Tidigare uppgifter om förekomsten av *F. hepatica* i Sverige finns endast från slakterirapporter. Slakteriuppgifterna är framtagna på individnivå och inte besättningsnivå som i denna undersökning. Inspektion av levrar på svenska slakterier har visat en prevalens på 5 % år 2008 (Dimander 2009) och 3 % år 2007 (Hegrestad 2008). Sammanställningen från slakteridata omfattar individer i alla djurkategorier och insamlas under hela året. Denna undersökning inkluderar endast de lakterande djuren på besättningsnivå undersökta vid samma tidpunkt, men från två provtagningstillfällen i augusti 2005 och 2006. Enligt studier utförda i Schweiz, upptäcks endast två tredjedelar av de infekterade levrarna vid slakteriinspektion (Rapsch *et al* 2006). Om förhållandena är liknande i Sverige, bör den verkliga prevalensen på slakterier hos nötkreaturen vara högre än de rapporterade 5 % (Dimander 2009).

Som tidigare nämnts bör provtagning för analys av antikroppar mot *F. hepatica* utföras under vintern, eftersom störst mängd infektiiva stadier av parasiten förekommer under sensommaren och hösten (Salimi-Bejestani *et al* 2005). Denna studies mjölkprover var insamlade under augusti, vilket således ej är optimalt i detta avseende. Provtagnings tidpunkten för denna studie innebär sannolikt att den verkliga infektionsnivån är underskattad. I augusti har djur som i själva verket infekterades under sommaren ännu inte hunnit påbörja sin antikroppsproduktion, vilket sker senare under hösten och vintern. Djur som infekterades föregående sommar kan dock ha kvarstående antikroppar även nästföljande sommar.

Den låga prevalensen i denna studie kan även bero på att den omfattar flera besättningar belägna i områden med en förväntat låg förekomst av *F. hepatica*. Störst förekomst kan förväntas i sydvästra Sverige (Dimander 2009), på grund av detta landområdes fuktigare väderleksförhållanden och mildare klimat. Förekomsten av *F. hepatica* är främst lokaliserad till dessa områden förutsatt att det finns passande habitat för parasitens mellanvärdar. Detta överensstämmer i stort sett också med resultaten från denna studie, där 5 av de 7 (71 %) positiva besättningarna befann sig i Sveriges sydvästra kustområde och i huvudsak längs Skånekusten.

I områden med hög risk, baserat på klimat- och miljöbetingelser, bör djurägare och veterinärer vara extra uppmärksamma på förekomst och konsekvenser av *F. hepatica*. Undersökning av antikroppar i tankmjölkprover med ELISA är ett enkelt sätt att övervaka läget på besättningsnivå. Ett framtida övervakningsprogram kräver dock att infektionen diagnostiseras korrekt och med hög precision. Enligt en tidigare studie har det visat sig att Institut Pourquiers ELISA med tankmjölkprover endast hittar besättningar med en gårdsprevalens över 60 % (Reichel *et al* 2005). Om detta är sant innebär detta en risk för att flera

infekterade besättningar inte upptäcks i tid. I de riktlinjer för tolkning av provsvaren som finns i instruktionerna till test-kitet från Institut Pourquier (2008) anges dock att den undersökta besättningens infektionsgrad kan fastställas med hjälp av ELISAn på en lägre nivå än 60 %. De kommenterar dock att deras angivna gränser för hur kraftigt infekterad besättningen är endast är vägledande, eftersom antikropps mängden i varje enskilt mjölkprov som ingår i tankmjölksprovet påverkar resultatet. Utav detta kan man sluta sig till att ytterligare studier kan behövas för att fastställa vid vilken infektionsnivå besättningarna måste ligga på för att bli identifierade som positiva.

Hur värddjuret påverkas av en *F. hepatica*-infektion är individuellt. Under World buiatrics congress 2006 (Vercruyse *et al* 2006) föreslogs att en tröskelnivå för antikroppar mot leverflundra hos nötkreatur bör fastställas, och att gränsvärdet ska ligga på en sådan nivå där produktionsförluster kan ses. Ur ett djurägarperspektiv är det onekligen viktigare att identifiera de individer vars infektion ger en minskad produktion, än att identifiera samtliga infekterade djur i drabbade besättningar. Tröskelvärdet skulle kunna bli en indikator för när det är aktuellt att behandla även subkliniskt sjuka djur och därmed minimera produktionsförlusterna. Hur stor den ekonomiska vinsten blir av att behandla djuren vid olika stora infektionsbördor måste dock först fastställas. En viktig faktor är att subklinisk sjukdom gör att djuren även blir mer mottagliga både för andra sekundära infektioner och metaboliska störningar. Att förebygga infektioner av *F. hepatica* har därför generellt sett en positiv effekt såväl på produktionen som den övriga djurhälsan i besättningen.

Eftersom mellanvärdarnas krav på lämpliga habitat är relativt specifika, kan parasitmängden kontrolleras med hjälp av betesplanering. Att helt utrota förekomsten av *F. hepatica* anses dock mer eller mindre omöjligt. Målet för ett genomtänkt kontrollprogram blir därför att hålla prevalensen på en så låg nivå som möjligt, vilket gör att mjölkproduktionen och därmed ekonomin påverkas i lägre utsträckning (Charlier *et al* 2007).

En övervakning via undersökning av tankmjölkprover är att föredra framför blodprover, eftersom det blir både enklare och billigare. Eftersom påvisad antikropps förekomst inte nödvändigtvis betyder att djuret har en pågående infektion måste ytterligare information vägas in, till exempel slakteristatistik och behandlingshistoria. Mjölkproduktionen påverkas av flera faktorer, däribland andra parasitangrepp. Det är dessutom svårt att på ett rättvist sätt mäta effekterna av hur olika skötselrutiner, foderstater och geografiska skillnader påverkar förlusterna av produktionen hos mjölkorna (Vercruyse och Claerebout 2001). I en besättning infekterad med *F. hepatica* behöver därför inte angreppen av leverflundra vara den enda orsaken till en minskad produktion. I denna studie ingick ett för litet antal besättningar för att kunna uttala sig om mjölkproduktionen är påverkad i de positiva besättningarna eller inte.

I länder som England och Wales (Pritchard *et al* 2005; Salimi-Bejestani *et al* 2005) har förekomsten av *F. hepatica*-infektioner ökat. Om en liknande ökning sker i Sverige är inte klarlagt eftersom systematiskt genomförda baslinjestudier tidigare har saknats. Ökningen som ses i andra länder misstänks bero bland annat på förändringar i klimatet i kombination med ett ändrat betesutnyttjande. Mildare

klimat och ökad regnmängd med fler översvämmade marker anses gynna både parasiten och dess mellanvärdar. Mildare klimat ger dessutom längre betesperioder, vilket ökar risken för att djuren ska utsättas för smittan. En längre tid på betet kan leda till en utökad användning av avmaskningsmedel, vilket kan skynda på resistensutvecklingen hos parasiten. Översvämningarna kan leda till att mindre ytor betas, vilket ger tätare djurpopulationer (Kenyon *et al* 2009). Vilka marker som utnyttjas är även beroende av politiska beslut om bidrag och landskapsvårdsersättningar.

I Storbritannien har förflyttningen av får från områden med *F. hepatica* till tidigare fria områden eventuellt orsakat en spridning av parasiten (Pritchard *et al* 2005). Förändrade väderförhållandena är delvis orsaken till dessa förflyttningar och innebär även att *F. hepatica* kan etablera sig i de nyinfekterade besättningarna. Ökade regnmängder och lokala översvämningar leder till att kvarvarande habitat bildas för både parasiten och dess mellanvärd (Kenyon *et al* 2009). Eventuellt kan förändrade väderförhållanden även ge ett liknande problem i Sverige. Parasiten kommer sannolikt att öka i områden där den redan finns idag, samt sprida sig till intilliggande områden där det tidigare inte funnits lämpliga habitat.

Enligt denna studie är *F. hepatica* idag inget utbrett problem bland mjölkbesättningarna i Sverige. Proverna insamlades dock vid en tidpunkt på året då antikroppar mot parasiten inte ännu bildats i någon högre utsträckning. Vidare riktad undersökning av prover insamlade under vintern i begränsade riskområden, exempelvis i landets sydvästra delar, bör utföras snarast för att få en bättre bild av leverflundrans betydelse. Eventuellt utgör andra djurkategorier en större riskgrupp. Till skillnad från mjölkkor kan exempelvis köttdjur hållas i extensiv drift med tillgång till bete under en längre tid av året. Köttdjuren hålls eventuellt även på andra typer av gräsmarker än mjölkkor och träffar därmed på *F. hepatica* i en annan utsträckning. Förekomsten av *F. hepatica* bör kunna sammanlänkas med djurens betesmiljö på de enskilda gårdarna. Det skulle även vara intressant att se om betesrelaterade insatser i besättningar med *F. hepatica* verkligen minskar förekomsten av parasitangreppen.

Fasciola hepatica sprider sig alltså och hittar nya jaktmarker. Provtagning av tankmjölk kan bli ett led i övervakningen av denna utbredning. Med de pågående förändringarna i klimatet och nya skötsel förutsättningar i besättningarna kan den idag uppmätta prevalensen snabbt förändras.

ERKÄNNANDE

Jag vill tacka Johan Höglund för god vägledning och Kasia Godzik för välbehövlig handledning vid laboratoriearbetet.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Albihn, A. Andersson, Y. Lindgren, E. 2008. Klimatförändringen – vad händer med djurhälsan? Svensk Veterinärtidning 7, 13-20.
- Bennema, S. Vercruyse, J. Claerebout, E. Schnieder, T. Strube, C. Ducheyne, E. Hendrickx, G. Charlier, J. 2009. The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). Veterinary Parasitology 165, 51-57.
- Castro, E. Freyre, A. Hernández, Z. 2000. Serological responses of cattle after treatment and during natural re-infection with *Fasciola hepatica*, as measured with a dot-ELISA system. Veterinary Parasitology 90, 201-208.
- Charlier, J. De Meulemeester, L. Claerebout, E. Williams, D. Vercruyse, J. 2008. Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. Veterinary Parasitology 153, 44-51.
- Charlier, J. De Meulemeester, L. Claerebout, E. Williams, D. Vercruyse, J. 2007. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. Preventive Veterinary Medicine 78, 57-66.
- Conceição, M.A.P. Durão, R.M.B. Costa, I.M.H. Castro, A. Louzã, A.C. Costa, J.C. 2004. Herd-level seroprevalence of fasciolosis in cattle in north central Portugal. Veterinary Parasitology 123, 93-103.
- Cringoli, G. Rinaldi, L. Veneziano, V. Capelli, G. Malone, J.B. 2002. A cross-sectional coprological survey of liver flukes in cattle and sheep from an area of the southern Italian Apennines. Veterinary Parasitology 108, 137-143.
- Dalton, J.P. O'Neill, S. Stack, C. Collins, P. Walshe, A. *et al.* 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. International Journal for Parasitology 33, 1173-1181.
- Happich, F.A. Boray, J.C. 1969. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. Australian Veterinary Journal 45, 326-328.
- Hegrestad, O.M. 2008. Leverflundra – på både torra och blöta marker. Djurhälsonytt 1, 17-18.
- Hegrestad, O.M. 2005. Två typer av leverflundra. Nötkött, särtryck Fokus på Djurhälsa, krönikor 2003-2006, 18.
- Hutchinson, G. MacArthur, E. 2003. Validation of French antibody ELISA for liver fluke. Final report, Animal health and welfare, Meat & Livestock Australia (MLA), 1-10.
- Jayaraj, R. Piedrafita, D. Dynon, K. Grams, R. Spithill, T.W. Smooker, P.M. 2009. Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. Veterinary Parasitology 160, 230-236.
- Kenyon, F. Sargison, N.D. Skuce, P.J. Jackson, F. 2009. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. Veterinary Parasitology 163, 293-297.
- Kemper, N. Henze, C. 2009. Effects of pastures' re-wetting on endoparasites in cattle in northern Germany. Veterinary Parasitology 161, 302-306.
- Kofta, W. Mieszczanek, J. Plucienniczak, G. Wędrychowicz, H. 2000. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. Vaccine 18, 2985-2990.

- Mas-Coma, S. Valero, M.A. Bargues, M.D. 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology* 163, 264-280.
- Mitchell, G. 2002. Update on fasciolosis in cattle and sheep. *Farm animal practice*, juli/augusti, 378-385.
- Moll, L. Gaasenbeek, C.P.H. Vellema, P. Borgsteede, F.H.M. 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology* 91, 153-158.
- Molloy, J.B. Anderson, G.R. Fletcher, T.I. Landmann, J. Knight, B.C. 2005. Evaluation of a commercially enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology* 130, 207-212.
- Murphy, T.M. Fahy, K.N. McAuliffe, A. Forbes, A.B. Clegg, T.A. O'Brian, D.J. 2006. A study of helminth parasites in culled cows from Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 76, 1-10.
- Pritchard, G.C. Forbes, A.B. Williams, D.J.L. Salimi-Bejestani, M.R. Daniel, R.G. 2005. Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *Veterinary Record* 157, 578-562.
- Rapsch, C. Dahinden, T. Heinzmann, D. Torgerson, P.R. Braun, U. Deplazes, P. Hurni, L. Bär, H. Knubben-Schweizer, G. 2008. An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. *Veterinary Parasitology* 154, 242-249.
- Rapsch, C. Schweizer, G. Grimm, F. Kohler, L. Bauer, C. Deplazes, P. Braun, U. Torgerson, P.R. 2006. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology* 36, 1153-1158.
- Reichel, M.P. Vanhoff, K. Baxter, B. 2005. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology* 129, 61-66.
- Reichel, M.P. 2002. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology* 107, 65-72.
- Salimi-Bejestani, M.R. Cripps, P. Williams, D.J.L. 2008. Evaluation of an ELISA to assess the intensity of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Veterinary Record* 162, 109-111.
- Salimi-Bejestani, M.R. Daniel, R. Cripps, P. Felstead, S. Williams, D.J.L. 2007. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. *Veterinary Parasitology* 149, 290-293.
- Salimi-Bejestani, M.R. Daniel, R.G. Felstead, S.M. Cripps, P.J. Mahmood, H. Williams, D.J.L. 2005. Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *Veterinary Record* 156, 729-731.
- Sánchez-Andrade, R. Paz-Silva, A. Suárez, J.L. Panadero, R. Pedreira, J. López, C. Díez-Baños, P. Morrondo, P. 2002. Influence of age and breed on natural bovine fasciolosis in an endemic area (Galicia, NW Spain). *Veterinary Research Communications* 26, 361-370.

- Schweizer, G. Meli, M.L. Torgerson, P.R. Lutz, H. Deplazes, P. Braun, U. 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Veterinary Parasitology* 150, 164-169.
- Schweizer, G. Braun, U. Deplazes, P. Torgerson, P.R. 2005. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* 157, 188-193.
- Sveide, R. 2003. Lathund för besiktningsveterinärorganisationen. Livsmedelsverket. s 27.
- Urquhart, G M. Armour, J. Duncan, J L. Dunn, A M. Jennings, F W. 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Vercruysse, J. Charlier, J. Dorny, P. Claerebout, E. 2006. Diagnosis of helminth infections in cattle: were we wrong in the past? World buiatrics congress 2006, Nice, Frankrike. www.ivis.org
- Vercruysse, J. Claerebout, E. 2001. Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle: defining the threshold. *Veterinary Parasitology* 98, 195-214.

Internet:

- Dimander, S.O. 2009. Stora leverflundran ett ökande problem? Svenska Djurhälsovården. Hemsida: www.svdhv.org/nyhemsida/Artiklar/090929_not_leverflundran.html
Uppdaterad: 2009-09-29. Besöksdatum: 2009-11-16
- Rosby Centre, SMHI 2007. Allmänt om klimat. Hemsida: www.smhi.se/sgn0106/leveranser/sverigeanalysen/
Uppdaterad: 2008-09-24. Besöksdatum: 2009-11-11
- SMHI Klimat. 2005. Frågor och svar angående klimatet. Klimatforskningens FAQ på svenska. Hemsida: www.smhi.se/sgn0106/if/rc/faq.htm
Uppdaterad: 2005-07-27. Besöksdatum: 2009-11-23
- Svensk Mjölk, Swedish dairy association. Hemsida: www.svenskmjolk.se
Uppdaterad: 2009-04-17. Besöksdatum: 2009-09-25
- Antal kor i Sverige:
www.svenskmjolk.se/ImageVault/Images/id_462/scope_128/ImageVaultHandler.aspx
- Anslutning med medelavkastning i officiell Kokontroll:
www.svenskmjolk.se/ImageVault/Images/id_1156/scope_128/ImageVaultHandler.aspx

Manualer:

- Bio-X Diagnostics. 2008. Bio-X Bovine *Fasciola hepatica* antigenic ELISA kit (BIO K 201). Belgien. Manual.
- Institut Pourquier. 2008. Immunological diagnosis of fasciolosis by ELISA method in sera and milk. Frankrike. Manual.