



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

Nodulär onchocercos på kronhjort (*Cervus elaphus*) i Sverige

Bim Boijesen

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:22*

Nodulär onchocercos på kronhjort (*Cervus elaphus*) i Sverige

Nodular onchocercosis in red deer (Cervus elaphus) in Sweden

Bim Boijesen

Handledare: Johan Höglund, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Henrik Uhlhorn, SVA, Avdelningen för patologi och viltsjukdomar

Biträdande handledare: Erik Ågren, SVA, Avdelningen för patologi och viltsjukdomar

Examinator: Adam Novobilsky, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0751

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:22

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: *Onchocerca flexuosa*, subkutana noduli, nodulär onchocercos, artbestämning, hjortdjur, DNA, Sverige

Key words: *Onchocerca flexuosa*, subcutaneous nodules, nodular onchocercosis, species identification, cervid, DNA, Sweden

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Släktet *Onchocerca* är globalt spridda vektoröverförda filaroida parasiter som främst infekterar olika vilda och domesticerade hovdjur. Även hund och människa kan infekteras av enstaka arter. Europeisk kronhjort, *Cervus elaphus*, är huvudvärd för minst fyra arter av *Onchocerca* varav två påträffas inuti subkutana noduli. Förekomsten av subkutan nodulär onchocercos undersöktes *post mortem* hos 151 kronhjortar (8 kalvar, 99 ungdjur, 44 vuxna djur) i huvudsak från hjorthägn under perioden 1 oktober - 30 december 2015 i mellersta och södra Sverige. Subkutana noduli (parasitknölar) påträffades hos 56 % av djuren (84/151) varav 96 % hade parasiter lokaliserade till ländryggen. Sammanlagt 35 % av de infekterade djuren hade dessutom noduli på andra ställen av kroppen såsom bakdel, bröst och framdel. Majoriteten (98 %) av individerna med knölförekomst hade mindre än 50 stycken och två tredjedelar av alla infekterade hade mellan 1- 10 stycken knölar. Signifikant skillnad i prevalens av individer med knölar sågs mellan vuxna hjortar (81 %) och ungdjur under två år (45 %)($p < 0,0001$) och även mellan hondjur (72 %) och handjur (48 %) ($p = 0,0072$). Artbestämning av parasiter från 14 slumpvist utvalda noduliprover från lika många hjortindivider från sju olika hägn gjordes genom sekvensering av 12S- och 16S generna samt ND5 regionen i parasitens mitokondriella DNA. Samtliga DNA-sekvenser var identiska med tidigare publicerade sekvenser av *Onchocerca flexuosa*. Den höga prevalensen samt utbredning av nodulär onchocercos orsakad av *O. flexuosa* hos svenska kronhjortar i denna studie tyder på att vektorförhållandena och miljöbetingelser i de undersökta delarna av mellersta och södra Sverige är gynnsamma för parasitens spridning. Parasitens artidentitet har verifierats genom DNA-sekvensering. Den här studien är den första som beskriver utbredningen av *O. flexuosa* hos kronhjort i mellersta och södra Sverige.

Sökord: Hjortdjur, *Onchocerca flexuosa*, subkutan noduli/knöl, nodulär onchocercos, artbestämning, DNA, Sverige

SUMMARY

Vector transmitted parasites of the genus *Onchocerca* have a worldwide distribution infecting wild and domesticated ungulates. A few species also infect canids and humans. European red deer, *Cervus elaphus*, host at least four species of *Onchocerca* of which two are found in subcutaneous nodules. The prevalence of subcutaneous nodular onchocercosis was investigated *post mortem* in 151 red deer (8 calves, 99 young and 44 adults) between 1st October - 30th December 2015. The animals mainly originating from enclosures in the middle and the southern parts of Sweden. The prevalence of subcutaneous nodules was 56% (84 of 151 individuals) and 96% of the parasitized animals had nodules located in the dorsal region of back. A total of 38% of the infected also had parasites in other locations on the body, such as rump, thorax and front legs and neck. The majority (98%) of the infected cervids had less than 50 noduli and two-thirds of the infected animals had between 1-10. Significant differences in prevalence of nodules were found between adult red deer (81%) and young individuals under two years (45%) ($p = 0.0001$) and also between males (48 %) and females (72 %) ($p = 0.0072$). Species identification was done in 14 randomly selected samples from the same number of individuals by sequencing the mitochondrial 12S, 16S and ND5 fragments. The sequences were identical to those of previously published sequences for *Onchocerca flexuosa*. The high prevalence of nodular onchocercosis caused by *O. flexuosa* in the red deer in Sweden in this

report shows that the investigated areas in middle and southern part of Sweden have favourable vector conditions and suitable environment for the parasite's distribution. The parasite species was confirmed by DNA sequencing. This is the first study of *O. flexuosa* prevalence in red deer in Sweden.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	1
Släktet <i>Onchocerca</i>	1
<i>Onchocerca</i> -infektion.....	6
Kronhjort i Sverige.....	8
Material och metod.....	9
Studieområde.....	9
Datainsamling.....	10
Artbestämning	10
Dataanalys	11
Resultat.....	11
Utseende och lokalisation.....	11
Artbestämning	11
Epidemiologi	12
Diskussion	13
Konklusion	15
Tack.....	15
Referenser.....	15
Appendix 1 Extraktion av DNA enligt NucleoSpin® Tissue protokoll	
Appendix 2 Metod för parasitär analys och artbestämning	
Appendix 3 Enkät kronhjort: Förekomst och orsak till parasit innehållande knölar under huden	

INLEDNING

Filaroida parasiter inom släktet *Onchocerca* finns spridda över hela världen och infekterar främst olika hov- och klövdjur såsom hjortar, hästar, idisslare och kameler (Morales-Hojas *et al.*, 2006). Vissa arter kan även drabba hund och människa (Morandi *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2015). *Onchocercos* sprids med knott och svidknott och är en vektoröverförd parasitsjukdom (Stiles 1892) som, beroende på parasitart, kan variera från relativt lindrig till mycket allvarlig. Parasiterna (bindvävsmaskarna) är relativt artspecifika och återfinns i subkutan vävnad på värdjurets kropp där de olika arterna av *Onchocerca* har sin specifika lokalisering (Bain & Schultz-Key, 1974; Morandi *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2015). Maskar inom släktet *Onchocerca* har en betydande evolutionär potential till värdskifte vilket gör att *Onchocerca* spp har potential att kolonisera nya värdarter (Dudley *et al.*, 2015). Enstaka fall av zoonoser har dokumenterats (Orihel & Eberhard, 1988; Dudley *et al.*, 2015). Minst fyra *Onchocerca*-arter finns beskrivna hos europeisk kronhjort, *Cervus elaphus*, varav två arter förekommer inuti knölar i underhuden. Flera studier visar att onchocerca-förekomst är relativt vanlig på kronhjort i centrala och södra delarna av Europa (Hidalgo *et al.*, 2015). Inga systematiska studier på parasitens utbredning hos svenska hjorddjur har tidigare gjorts. Huvudsyftet med denna undersökning var att utreda i vilken omfattning nodulär onchocercos förekommer hos svenska kronhjortar och artbestämma den parasit som återfinns intranodulärt i underhuden. Hypotesen var att samma parasitart orsakar nodulär onchocercos över hela landet.

LITTERATURÖVERSIKT

Litteraturöversikten inleds med en översikt av parasitarter inom släktet *Onchocerca* och beskriver parasiternas livscykel inklusive de biologiska vektorer som medverkar till att sprida maskarna. Vidare avhandlas parasiternas förekomst hos hovdjur och i synnerhet hjorddjur samt hur infektionen påverkar värdjuret. Olika behandlingsstrategier mot infektion presenteras och förklaring till varför behovet och nyttan av behandling varierar mellan värdjur. Litteraturöversikten avslutas med en översikt av parasitens värdjur, kronhjortspopulationen i Sverige, och vad som har påverkat populationen historiskt samt hur arten lever idag.

Släktet *Onchocerca*

Parasitmaskar inom släktet *Onchocerca*, är långa trådtunna rundmaskar (nematoder) inom överklassen *Filarioidea* (Bain & Schultz-Key, 1974). Det finns idag 31 kända arter av *Onchocerca* (Uni *et al.*, 2007) med global spridning hos olika däggdjur (Morales-Hojas *et al.*, 2006) (Tabell 1). Främst infekteras vilda och domesticerade hov- och klövdjur medan enstaka arter även förekommer hos hund (*O. lupi*) och människa (*O. volvulus*) (Wildenburg *et al.*, 1997; Anderson, 2000; Morales-Hojas *et al.*, 2006; Dudley *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2015). *Onchocerca* har en indirekt livscykel med olika undergrupper av myggor (knott och svidknott) som mellanvärdar. Olika *Onchocerca*-arter är mer eller mindre värdjursspecifika och de förekommer även hos slutvärderna på specifika lokaliseringar på värdjurets kropp. De flesta arterna förekommer i underhuden hos huvudvärderna med undantag för *O. armillata* som återfinns i aortas kärlvägg (Anderson, 2000). Mikrofilarier av *Onchocerca* hittas främst i

subkutan vävnad, ligament och senhinnor (Anderson, 2000) till skillnad från de vuxna han- och honparasiterna som även kan påträffas inuti bindvävsknutor i underhuden (Bain & Schultz-Key, 1974). Prepatensperioden, tiden från infektion av mikrofilarie tills dess att nya mikrofilariier kan återisoleras på nytt i värdjuret, är hos hjortdjur mellan sex (Schulz-Key, 1975) och nio månader (Frank *et al.*, 1968).

Släktet *Onchocercas* morfologi och artrikedom tyder på att parasiten ursprungligen kommer från Afrika (Morales-Hojas, 2009) vilket varken har kunnat verifieras eller dementeras av andra källor (McFrederick *et al.*, 2013). Idag finns släktet *Onchocerca* spritt över hela världen och en tredjedel av alla beskrivna arter förekommer i Afrika där mellanvärdarna har en gynnsam miljö (Krueger *et al.*, 2007). En stor andel av alla *Onchocerca*-arter associeras med hov- och klövdjur, i synnerhet hjortdjur. Hjortdjur och slidhornsdjur har historiskt sätt spelat en nyckelroll för släktet *Onchocercas* evolution (McFrederick *et al.*, 2013) och influerat arternas utveckling stort då maskarna har förmåga att kunna skifta slutvärd mellan närbesläktade värdjur. (Morales-Hojas *et al.*, 2006; Krueger *et al.*, 2007; Morales-Hojas. 2009; McFrederick *et al.*, 2013). Exempelvis anses den humana *O. volvulus* komma av ett värdskifte från slidhornsdjur till människa (Morales-Hojas *et al.*, 2006; McFrederick *et al.*, 2013). Även andra fall av zoonoser av *Onchocerca*-arter har dokumenterats (Orihel & Eberhard., 1988); med (Koehsler *et al.*, 2007) och utan (Dudley *et al.*, 2015) ursprung från idisslare.

Tabell 1: *Onchocerca* spp. finns dokumenterat på hovdjur, hund och människa och återfinns framför allt i huvudvärdens underhud men finns ibland även i ligament och senhinnor

Familj	Art	HV*	MV*	Predilektionsställe	Källa*
Hjortdjur <i>Cervidae</i>	<i>O. flexuosa</i>	Kronhjort, <i>Cervus elaphus</i> ,	S, C	subkutant (noduli) dorsalt, lår, flank	Wedl 1856. Morandi <i>et al.</i> , 2011
	<i>O. jakutensis</i> / <i>O. tubingensis</i>	Kronhjort, <i>C. elaphus</i> ,	S, C	subkutant (noduli) dorsokaudalt	Gubanov 1964. Morandi <i>et al.</i> , 2011
	<i>O. tarsicola</i> / <i>O. skrjabini</i>	Kronhjort, <i>C. elaphus</i> , Ren, <i>Rangifer tarandus</i>	S	subkutant runt tibio-tarsal/ radio-karpal leder mf i öron	Bain & Schultz-Key 1974. Ruchljadev 1964. Wildenburg <i>et al.</i> , 1997
	<i>O. garmsi</i>	Kronhjort, <i>C. elaphus</i> , Europeisk	*	subkutant	Bain & Schulz-Key 1976. Hidalgo <i>et al.</i> , 2015
	<i>O. cervipedis</i>	Hjortdjur (Nordamerika) <i>Cervidae</i> spp	*	subkutant ffa på extremiteter	*
	<i>O. eberhardi</i>	Sikahjort <i>C. nippon</i>	*	karpalligament mf i öra	*
					Uni <i>et al.</i> , 2007
Hästdjur <i>Equidae</i>	<i>O. cervicalis</i>	Häst, mula, åsna <i>Equus</i> spp	C	nackband	Railliet & Henry 1910. Anderson, 2000
	<i>O. reticulata</i>	-"-	C	gaffelband, ffa på framben	Diesing 1841. Anderson, 2000
	<i>O. raillieti</i>	Åsna <i>E. a asinus</i>	*	nackband	*
				Krueger <i>et al.</i> , 2007	
Slidhornsdjur <i>Bovidae</i>	<i>O. gutturosa</i>	Nötkreatur, <i>Bos taurus</i>	C	nackband, femorotibial ligament	Neumann 1910. Wildenburg <i>et al.</i> , 1997
	<i>O. lienalis</i>	-"-	S	gastrolienala regionen	Stiles 1892. Anderson, 2007
	<i>O. dukei</i>	-"-	*	*	*

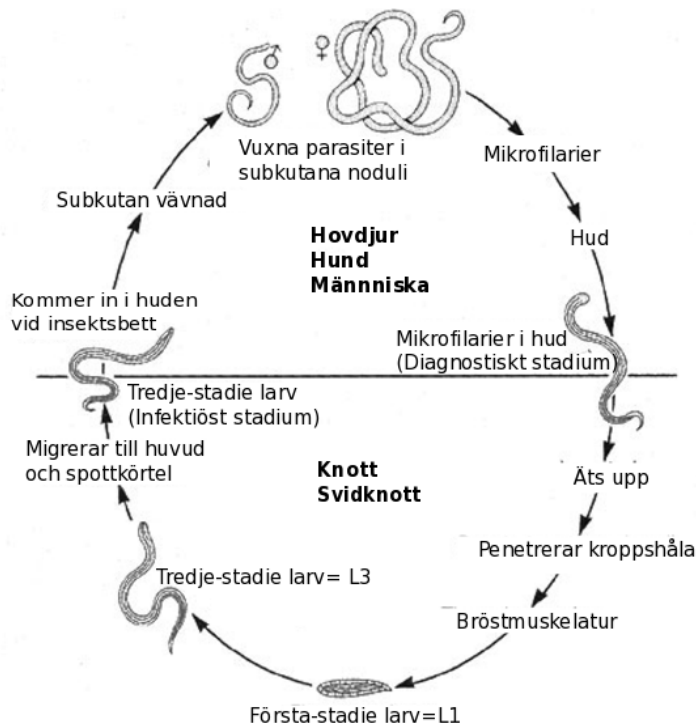
	<i>O. armillata</i>	-"-	O	*	* Krueger <i>et al.</i> , 2007
	<i>O. stilesi</i>	Nötkreatur <i>B. taurus</i>	*	subkutant i knäregion	* Krueger <i>et al.</i> , 2007 Eberhard, 1979
	<i>O. gibsoni</i>	Nötkreatur, <i>B. taurus</i> Zebu <i>B. indicus</i> ,	C	intercostalrum	Cleland & Johnson 1910. Anderson, 2000
	<i>O. ochengi</i>	-"-	S	*	Bwangamoi 1969. Anderson, 2000
	<i>O. cebei</i> / <i>O. sweetae</i>	Vattenbuffel <i>B. bubalis</i>	*	pektoralregion mf i ytliga hudlager vid (flank, sternum, bog)	Galliard 1937. Anderson, 2000
	<i>O. sonini n. sp</i>	Antiloper <i>Cephalophus</i> spp	*	falangsenor	* Bain <i>et al.</i> , 1978: se Krueger <i>et al.</i> , 2007 s11
	<i>O. lerouxi n. sp</i>	-"-	*	bål	* Bain <i>et al.</i> , 1978: se Krueger <i>et al.</i> , 2007 s11.
	<i>O. beaveri</i>	-"-	*	*	* Bain <i>et al.</i> , 1978: se Krueger <i>et al.</i> , 2007 s11.
	<i>O. suzukii</i>	Stenbockar <i>Capricornis spp</i>	*	subkutant	* Takaoka <i>et al.</i> , 2004
	<i>O. schulzkeyi</i>	Hästantilop <i>Hippotragus</i> <i>equinus</i>	*	kutant (noduli)	Denké & Bain 1981. Krueger <i>et al.</i> , 2007
	<i>O. hamoni</i>	Vattenbockar <i>Kobus spp</i>	C	subkutant (noduli)	Denké & Bain 1981. Krueger <i>et al.</i> , 2007
Svindjur <i>Suidae</i>	<i>O. ramachandrini</i>	Vårtsvin <i>Phacochoerus</i> <i>aethiopicus</i>	S	subkutant vid falanger	Bain, Wahl & Renz 1993. McFrederick <i>et al.</i> , 2013
	<i>O. dewittei</i>	Vildsvin <i>Sus scrofa</i>	S	subkutant, senor	* Bain <i>et al.</i> , 1977
Kameldjur <i>Camelidae</i>	<i>O. fasciata</i>	Kamel <i>Camelus spp</i>	*	subkutant	* McFrederick <i>et al.</i> , 2013
Hunddjur <i>Canidae</i>	<i>O. lupi</i>	Hund <i>Canis lupus</i>	S	kutant (noduli), ögon	Rodonaja 1967. Egyed <i>et al.</i> , 2001
Människa <i>Hominider</i>	<i>O. volvulus</i>	Människa <i>Homo sapiens</i>	S	subkutant, ögon	Leuckart 1893. Morales-Hojas., 2009

Ofullständiga uppgifter på grund av svårigheter att finna upphovsman och/eller originalartikel. Dokumenterad HV (huvudvärd), MV* (mellanvärd) och O (okänd). Mellanvärdar: S (*Simuliidae*) och C (*Ceratopogonidae*). Mikrofilarien (mf). Källa* (upphovsman samt hänvisning till studie).

Livscykel

Onchocerca spp. uppvisar en indirekt livscykel (Figur 1) där knott och svidknott både fungerar som mellanvärd och vektor. Utveckling från mikrofilarie till vuxen parasit sker genom alternerande livsstadier hos mellan- och slutvärden. Hög fuktighet och en temperatur kring 18-26°C är idealt för utvecklingen av maximalt antal larver på kortast tid (Taylor *et al.*, 2007). Mikrofilarien (larvstadium L1) produceras av befruktade honmaskar i subkutana noduli (WHO, 2015) och påträffas i underhuden kring noduli. Vid vektorns blodmål på huvudvärden tas mikrofilarien från värddjurets underhud upp av mellanvärden. Via vektorns kroppshåla (haemocoel) tar sig L1 sedan vidare till vektorns bröstmuskulatur där mikrofilarierna genomgår två hudömsningar innan de blir infektiösa tredje-stadie larver (L3). Hos mellanvärden

nå detta stadium efter 6-12 dagar beroende på temperatur (Duke, 1971). Det är dock först när L3 nått vektorns spottkörtel som de kan överföras till nya individer genom intag av blodmål på slutvärderna (Bush *et al.*, 2001). De vuxna parasiterna kan överleva hos huvudvärderna i flera år. En studie tyder på att *O. volvulus* kan leva upp till 16 år hos oss människor (Roberts *et al.*, 1967).



Figur 1: *Onchocerca* spp livscykel.

<http://img.medscape.com/fullsize/migrated/410/172/m1806.07.godd.fig2.jpg>
(2015.11.23)

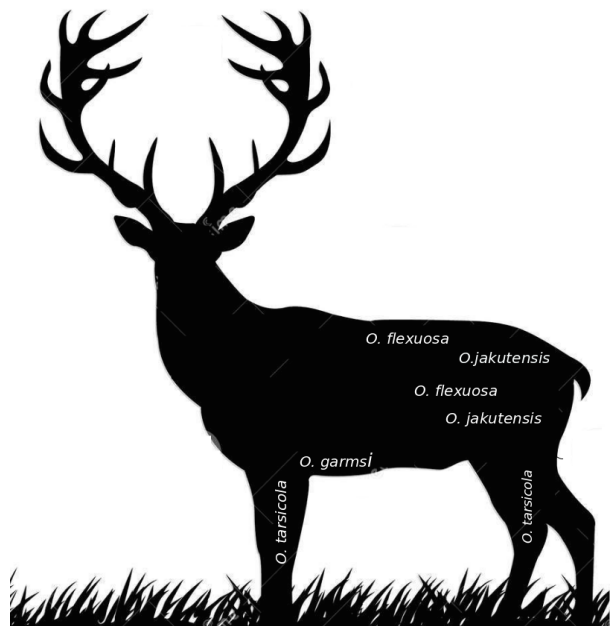
Mellanvärd och vektor

Mellanvärdar för *Onchocera* spp är knott (*Simuliidae*) och svidknott (*Ceratopogonidae*) som är familjer inom underordningen myggor (*Nematocera*) bland tvåvingarna (Morandi *et al.*, 2011). Mellanvärdarna för olika arter av *Onchocerca* fungerar som biologiska vektorer och tillåter parasiten genomgå nödvändiga utvecklingsstadier inuti sig själv samtidigt som de också fungerar som spridare av parasitens larver till nya slutvärdar (Taylor *et al.*, 2007). Olika typer av knott och svidknott trivs i delvis olika miljöer men uppvisar även varierande specificitet för olika värddjur. Även tidpunkt för blodmål samt bittlokalisering varierar med vektorart. Bara honorna intar blodmål, och det är följaktligen endast dessa som överför parasiten till slutvärderna. Honparasiterna attraheras av slutvärdens doft och värme (Taylor *et al.*, 2007) och massangrepp kan vara besvärande för värdjuret. Mellanvärdens äggkläckning tar normalt mellan 2-9 dagar och larverna tar sedan veckor till månader på sig att mogna och kan liksom äggen, vid kallare väderförhållanden, övervintra. Livslängden för en vuxen insekt är från ett par veckor upp till 85 dagar. Vuxna svidknott tenderar att vara aktiva vid mulen och fuktig väderlek och främst vid gryning och skymning (Taylor *et al.*, 2007). Flygaktiviteten påverkas av faktorer som temperatur, ljusintensitet, månens cykler, relativ fuktighet, vindstyrka och andra väderförhållanden. Insekterna är således beroende av ett visst klimat för att överleva och

deras bettaktivitet är i arktiska områden därför mer säsongsbunden till den varmare delen av året eftersom de vuxna insekterna dör på hösten och nya generationer insekter kläcks först till våren (Taylor *et al.*, 2007).

Onchocerca hos hjorddjur

Idag finns det fem dokumenterade arter av *Onchocerca* som parasiterar familjen hjorddjur; *O. flexuosa*, *O. jakutensis* (synonym med *O. tubingensis*), *O. tarsicola* (synonym med *O. skrjabini*), *O. garmsi* och *O. cervipedis*. Hos europeisk kronhjort (*Cervus elaphus*) finns fyra av dessa arter (Hidalgo *et al.*, 2015) och där de vuxna parasiterna har olika predilektionsställen i subkutan vävnad (Bain & Schultz-Key, 1974; Morandi *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2015) (Figur 2). Två arter; *O. flexuosa* (Wedl 1856) och *O. jakutensis* (Guvanov 1964), finns inuti subkutana nodulära strukturer hos slutvärderna (Bain & Schultz-Key, 1974). Trots likartat utseende hos knölnarna finns skillnader mellan parasiterna på DNA-nivå (Krueger *et al.*, 2007). *Onchocerca flexuosa* förekommer främst dorsalt på ländrygg och flanker (Bain & Schultz-Key, 1974; San-Miguel *et al.*, 2003; Hidalgo *et al.*, 2015), medan *O. jakutensis* påträffas på kaudodorsala delen av ryggen, lår (Bain and Schultz-Key, 1974) och övre delen av extremiteter (Demiaszkiewicz, 1993). *O. garmsi* förekommer vid sternum (Schulz-Key *et al.*, 1976), medan *O. tarsicola* i allmänhet ses längre ner på extremiteterna i höjd med tibio-tarsal och radio-karpalederna (Bain & Schultz-Key, 1974; Wildenburg *et al.*, 1997). Den sistnämnda arten ger inte upphov till noduli men kan däremot orsaka kraftig inflammatorisk reaktion (Schulz-Key, 1975; Wildenburg *et al.*, 1997).



Figur 2. Överblick av *Onchocerca* spp lokalisationer på värdjuret kronhjort, *Cervus elaphus*.

Onchocerca flexuosa (Wedl, 1856) anses tillsammans med *O. ramachandrini* och *O. armillata* vara ursprungliga arter inom släktet (Krueger *et al.*, 2007). Parasiten som är av specifikt intresse för denna studie, *O. flexuosa*, har kronhjorten som huvudvärd men har även sporadiskt återfunnits hos andra hjorddjur som rådjur, *Capreolus capreolus* (Demiaszkiewicz & Drózd, 1990) och antilop, *Hippotragus equinus* (Dikmans, 1933). Antalet infekterade hjortindivider har dock varit så lågt att dessa värddjur har klassats som atypiska slutvärdar. Tidigare gjorda studier visar på att *O. flexuosa* är den vanligaste arten på kronhjort i Europa och har ofta identifieras utifrån lokalisering och morfologiskt utseende (Bain & Schultz-Key, 1974). Artidentiteten kan också fastställas genom undersökning av vissa regioner i maskarnas mitokondriella DNA (Krueger *et al.*, 2007).

Tidigare studier av *O. flexuosa* på kronhjort från övriga europeiska länder visar på skiftande förekomst mellan olika länder och områden. I Spanien varierade den även regionalt; i centrala

Spanien var prevalensen av *O. flexuosa* på kronhjort 24 % (San-Miguel *et al.*, 2003) respektive 33 % (Santín-Durán *et al.*, 2001) medan den var betydligt högre (85 %) i nordvästra delar av landet (Hidalgo *et al.*, 2015). Enligt Hidalgo *et al.* (2015) varierar prevalensen i olika Europeiska länder stort¹: från 5 % i Tjeckien (Páv & Zajíček, 1981) till 96 % i Tyskland (Schulz-Key, 1975). Andra studier med rapporterad förekomst av *O. flexuosa* är 13 % i Rumänien (Dulceanu & Ghitescu, 1986), 60 % i Polen (Demiaszkiewicz, 1998), 33 % i Ukraina (Zhelizniak, 2003) och 63 % i Vitryssland (Shimalov & Shimalov, 2003).

Onchocerca-infektion

Den kliniska bilden av onchocercos skiljer sig åt mellan olika slutvärdar. Nodulär onchocercos på kronhjort orsakad av *O. flexuosa* uppstår genom slutvärdens reaktioner mot parasiten (Plenge-Bönig *et al.*, 1995; Wildenburg *et al.*, 1997; Hidalgo *et al.*, 2015). Inflammatoriska celler, främst eosinofiler och jätteceller (Wildenburg *et al.*, 1997) infiltrerar omkringliggande bindväv runt de tätt packade vuxna parasiterna varvid en hård, nodulär struktur formas i underhuden (Plenge-Bönig *et al.*, 1995; Hidalgo *et al.*, 2015)². Noduli kan bestå av enstaka eller ett flertal honparasiter, ensamma eller tillsammans med enstaka hanparasiter. Parasiterna inuti noduli är tätt ihoptvinnade med bindvävsstråk (Morandi *et al.*, 2011; Hidalgo *et al.*, 2015). Mikrofilarierna i underhuden framkallar också en stark inflammatorisk respons, främst efter att de har dött (Wildenburg *et al.*, 1997; WHO, 2015b). Den fulla effekten av infektion med *O. flexuosa* på hjortvilt är dock okänd (Hidalgo *et al.*, 2015). Parasiten kan orsaka lesioner som kan påverka individens hälsa samt vara orsak till kassering av slaktkroppen (Muller, 1979). Vanligtvis orsakar dock inte knölna genom sin lokalisering allvarlig sjukdom (Plenge-Bönig *et al.*, 1995). Köttkvaliteten påverkas normalt sätt inte då knölar som finns i underhudens hinnor relativt enkelt kan putsas bort från underliggande muskulatur (blivande styckdetaljer) efter avhudning.

Vissa *Onchocerca*-arter förekommer också hos människor där de i motsats till situationen hos de flesta andra värdjur ofta orsakar allvarlig sjukdom. Human onchocerciasis, eller flodblindhet, som orsakas av *O. volvulus* påträffas framför allt söder om Sahara i Afrika men även i Centralamerika, nordliga delar av Sydamerika samt Jemen. Sjukdomen har fått sitt namn från högriskområden med snabbt flytande strömmar och floder där vektorn trivs. Tiden från att människan blir infekterad till att mikrofilarien ses i huden är mellan 10-20 månader (Duke, 1971). Sjukdomen är resultat av den allergiska reaktion som framkallas hos huvudvärden vid förekomst av mikrofilarien i vävnaden (Ottesen, 1994: se Wildenburg *et al.*, 1997). Tydliga tecken på infektion med mikrofilarien är knölar i underhuden vilka ger kraftig klåda, missfärgning, förtjockning och förhårdnad av huden samt nedsatt hudelasticitet (Nelson, 1970) och ibland elephantiasis i de fall lymfkärnen påverkas (Taylor *et al.*, 2007). Vanligt är att

¹ Artiklarna som Hidalgo *et al.*, 2015 hänvisar till är skrivna på originalspråk varför originalkällan ej har granskats.

² Honorna av arten *O. flexuosa* har inte ett skyddande yttre hölje runt sig samt har tidigt degenererad somatisk muskulatur och rör sig därför mindre. Dessa faktorer anses vara orsaker till värdjurets tidiga och stora immunrespons kring honparasiterna (Plenge-Bönig *et al.*, 1995; Wildenburg *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2011).

mikrofilarierna infekterar hornhinnan, iris och synnerven vilket orsakar irreversibel blindhet. Sjukdomen är ett stort problem och i mellersta delarna av Afrika drabbas cirka 20 miljoner människor årligen (Taylor *et al.*, 2007; WHO, 2015). Fungerande kontrollprogram finns i flera länder och eliminering av parasiten med hjälp av återkommande årliga behandlingar har i flera länder varit möjlig (WHO, 2015).

Det finns 21 dokumenterade fall av zoonotiska infektioner orsakade av *Onchocerca* världen över (Dudley *et al.*, 2015). Flertalet framkallade främst av arter med olika hovdjur som ursprungliga slutvärdar; så som nötkreatur (*O. gutturosa*), häst (*O. cervicalis* och *O. reticulata*), europeisk kronhjort (*O. jakutensis*) och vildsvin (*O. dewittei japonica*) (Dudley *et al.*, 2015). Även fem zoonosfall med hundens *O. lupi* finns dokumenterade (Dudley *et al.*, 2015). Vid zoonos återfinns parasiten hos den nya värden i regel i motsvarande vävnad som hos huvudvärden (Orihel & Eberhard., 1988; Demiaszkiewicz, 1993). Vid fall hos människa, liksom hos hund, återfinns parasiten ofta i och runt ögonen (Dudley *et al.*, 2015). Ögonassocierade zoonotiska infektioner ökar ständigt i allvarlighetsgrad och antal kliniska fall (Otranto & Eberhard., 2011).

Behandling

Behandling mot infektion med *Onchocerca* på djur och människor sker vanligtvis genom avmaskning³. Vid fall på människa föregås avmaskningen ofta av kirurgisk extraktion och diagnosställande av parasiten (Otranto & Eberhard., 2011). Avmaskning med ivermektin reducerar antalet mikrofilarien i huden effektivt (Taylor *et al.*, 2007) men har inte effekt på de vuxna parasiterna (WHO, 2016). WHO (2015) rekommenderar därför att avmaska infekterade människor årligen under 10-15 års tid.

Avmaskningsmedel mot vanligt förekommande ekto- och endoparasiter hos hjorddjur i Sverige finns i form av granulat för oral behandling (fenbendazol) samt som injektions- eller pour-on-beredningar innehållande den aktiva substansen ivermektin. Ivermektin är en endektocid inom gruppen makrocycliska laktoner som binder selektivt till glutamatreglerande kloridjonkanaler i parasiten vilket orsakar en ökad permeabilitet för kloridjoner över cellmembran. Muskel- och nervceller i parasiten hyperpolariseras varvid parasiten paralyseras. Granulatpreparaten blandas vanligtvis in i fodret som distribueras till hela hägnpopulationen medan injektions- och pour-on preparaten kan användas vid hantering av enskilda djur. Vad gäller avmaskningsrutiner finns idag ingen konsensus bland hjorthägnägare i Sverige och hägnägare har olika syn och grad av upplevd problematik av parasiter generellt (Malmsten, J., Statens veterinärmedicinska anstalt, pers. medd., 2015-10-06; 2015; Svensson, K., Svensk Hjort, pers. medd., 2015-10-31). En del avmaskar sina djur rutinemässigt med jämna intervall, från en gång per år till en gång vart tredje år, medan andra avmaskar endast inför försäljning alternativt då sommararbetet tagit slut på hösten. Många hägnägare avmaskar endast vid tydliga tecken på parasitangrepp eller när

³ År 2015 fick William C. Campbell och Satoshi Ōmura Nobelpriset® i medicin för upptäckten av avermektin som i utvecklade form (ivermektin) är ett effektivt preparat för att reducera antalet mikrofilarien i huden (WHO, 2015; WHO, 2016). Avmaskning med ivermektin har stor roll i att förekomsten av flodblindhet och lymfatisk filariosis har minskat (Nobelprize.org, 2015).

positiva provsvar ges efter träckprovundersökning (Svensson, K., Svensk Hjort, pers. medd., 2015-10-31). Eventuell avmaskning på hjortdjur sker främst med avseende på andra parasiter än *Onchocerca*; så som gastrointestinala parasiter eller ektoparasiter i pälsen. Att avmaska med ivermektin enbart med fokus på *Onchocerca* anses inte nödvändigt (Hidalgo et al., 2015).

Kronhjort i Sverige

Historia

Kronhjorten har sitt ursprung i de södra delarna av Centralasien. Naturlig spridning har sedan skett till stora delar av norra halvklotet. Kronhjorten förekommer även, genom mänsklig introduktion, på Nya Zeeland, i Nordafrika och delar av Sydamerika. Till Sverige kom kronhjorten från Danmark när inlandsisen försvann för omkring 10 000 år sedan. Arten spred sig sedan vidare upp till Bohuslän, Dalsland, Västergötland, Östergötland, Mälardalen och Öland. Under 1800-talet minskade populationen stort på grund av jakt, tjuvskytte, vargpredation och ett förändrat terräng- och åkerlandskap (Svenska Jägareförbundet, 2012). I början av förra seklet bestod det skånska beståndet endast av ett 50-tal kronhjortar (Jarnemo, 2013).

Populationen i Sverige idag

Idag är kronviltet utbrett över stora delar av Sverige och det förekommer i samtliga län utom i Norrbotten och på Gotland (Jarnemo, A., Grimsö forskningsstation, pers. medd., 2015-10-12). De starkaste stammarna finns i Södermanland, Östergötland, Kalmar län samt i Skåne och nästan alla stammar uppges öka (Jarnemo, 2014). Förutom den skånska ursprungspopulationen och en sannolikt invandrad norsk population, härrör populationen i Sverige främst från utsättning eller rymning från olika hjorthägn vilket sannolikt förklarar den fläckvisa populationsutbredningen i landet.

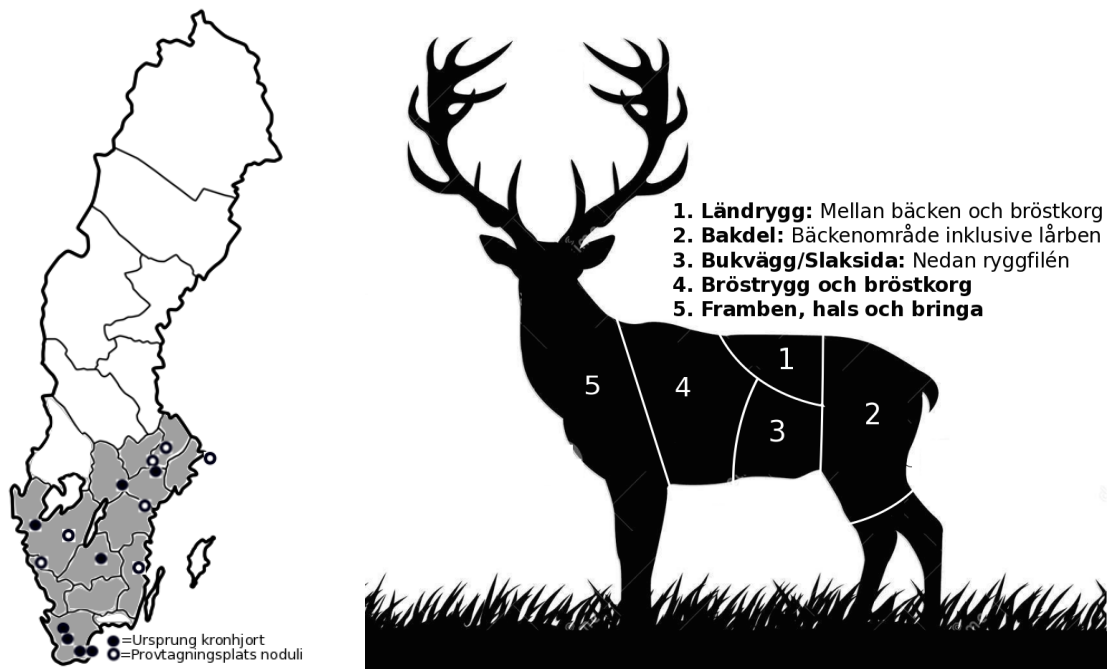
Kronhjorten har anpassat sig till många olika typer av vegetation; från jordbruksdominerat landskap i söder och barrskogslandskap i Mellansverige till det mer karga landskapet med längre vintrar i norr. Kronhjorten trivs bäst i bruten terräng med visst inslag av öppna marker och verkar kunna samexistera bra med annat klövvilt i Sverige då risken för födokonkurrens är relativt liten (Svenska Jägareförbundet, 2012). Svenska jägareförbundets viltövervakning *Fokusprojekt kron* uppskattar den nationella stammen frilevande kronvilt i Sverige år 2015 till ca 25 000 stycken djur. Antalet registrerade kronhjortar i hägn år 2014 var 6713 stycken men den faktiska siffran är troligen högre då inte alla hägn eller samtliga hägnade individer finns registrerade (Svensson, K., Svensk Hjort från Svenska Jordbruksverket, pers. medd., 2015-12-17). Avskjutningen av kronhjort som rapporterades till länsstyrelserna år 2014 var 6141 stycken med högst noteringar i Södermanland (1802 individer) och Kalmar (1039 individer). Avskjutningen har varit, och är även idag, mindre än tillväxten (Bergqvist, G., Svenska Jägareförbundet, pers. medd., 2015-10-20).

MATERIAL OCH METOD

Litteratursökning har gjorts i fackböcker, avhandlingar och databaserna PubMed, Web of Knowledge och Web of Science. Sökord som har använts är olika kombinationer av red deer, subcutaneous nodule, *Onchocerca flexuosa*, *Onchocerca* spp, cervids och ungulates. Endast ett fåtal studier inom området är publicerade på engelska.

Studieområde

Studien utfördes på 15 platser från geografiskt utspridda områden över 12 län i södra tredjedelen av Sverige (Figur 3). Län som ingick i studien var: Gävleborg, Halland, Jönköping, Kalmar, Skåne, Stockholm, Södermanland, Uppsala, Värmland, Västmanland, Västra Götaland och Östergötland. Klimatet och temperaturen varierar över studieområdet som omfattar två temperaturzoner. Större delen av studieområdet har ett kalltempererat klimat med snövintrar och där barrskog är dominerande vegetationstyp, medan det runt kustområdena i söder råder ett mer varmt tempererat klimat och mer framträdande lövskogsvegetation (SMHI, 2015). Regionen är skog- och sjörik med riklig biodiversitet. Närheten till norra Atlanten och Golfströmmen ger Sverige, trots nordligt beläget geografiskt, ett mildt klimat under vinterhalvåret med en medeltemperatur i januari kring -2°C . Den årliga medeltemperaturen var ca 10°C (ca 18°C i augusti) enligt SMHIs mätningar för 2015. Sedan ett kvarts sekel har dock en gradvis uppvärmning noterats. Nederbörd faller under hela året men är rikligast sommar och höst. Uppmätt årsnedbörd ligger runt 500-800 mm och under vintern faller nederbörden främst som snö i större delen av landet (SMHI, 2015).



Figur 3. Tv: Södra tredjedelen (grå) av Sverige utgör studieområdet för undersökning av subkutan noduliförekomst hos kronhjort, *Cervus elaphus*. Alla prickar illustrerar kända ursprungsplatser för kronhjortar i studien. Vita prickar visar även provtagningsplats för noduli.

Figur 4 Th: Olika lokaliseringsområden för eventuell förekomst av subkutana knölar på kronhjort.

Datinsamling

Under perioden 1 oktober – 30 december 2015 undersöktes 151 kronhjortar vid slakthantering på 8 utvalda vilthanteringsanläggningar (VHA) runt om i Sverige och dokumenterades med avseende på förekomst av subkutana knölar. Av kronhjortarna i studien kom 86 % (n=130) från hägn, 3 % (n=5) var frilevande och 11 % (n=16) var av okänt ursprung. Varje slaktkroppens individnummer noterades tillsammans med information om kön samt uppskattad ålder. Därefter skattades förekomst av subkutana knölar enligt en fyrgradig skala (0, 1-10, 11-50, >51) samtidigt som lokalisation på slaktkroppen för dessa registrerades (Figur 4). Fjorton stycken materialprover av knölar togs dorsalt på ländryggen från lika många slumpvis utvalda hjortar med ursprung från sju platser i södra tredjedelen av Sverige (Figur 3). Delar av parasiter från färskt nodulimaterial extraherades manuellt och bevarades i sprit inför molekylär parasitär analys.

Artbestämning

Vuxna maskar som isolerades från subkutana noduli artbestämdes enligt Krueger *et al.*, (2007) och Morales-Hojas *et al.*, (2006). Delar av filarier extraherades från samtliga knölar varefter mask DNA isolerades enligt NucleoSpin® Tissue kit (Appendix 1). Efter DNA extraheringen amplifierades tre gensekvenser från parasitens mitokondrie-DNA med hjälp av PCR (Polymerase Chain Reaction) och specifika primerpar (Tabell 2) (Appendix 2). De undersökta regionerna var dels två rRNA gener (12S och 16S), dels en proteinkodande gen (NADH dehydrogenas 5 (ND5)). För att kontrollera att PCR ampliferingen genererade DNA fragment av förväntad storlek separerades PCR produkten med gelelektrofores. Efter verifiering av amplikonen skickades dessa för sekvensering till Macrogen Inc, Amsterdam. Erhållna sekvenser identifierades slutligen genom jämförelse med befintliga sekvenser lagrade i GenBank med hjälp av BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Tabell 2. Vid molekylär identifiering av *Onchocerca flexuosa* användes olika primers för amplifiering av de mitokondriella genfragmenten; 12S och 16S generna samt proteinkodande genen ND5

Gen	Primer	Forward/ Reverse	Primersekvens	Referens
12S	12S OvC	F	5'-TCGGCTATGCGTTTTAATTTT -3'	Hidalgo <i>et al.</i> , 2015 McFrederick <i>et al.</i> , 2013
	12S OvB	R	5'-CAACTTACGCCCTTTAGGC -3'	Krueger <i>et al.</i> , 2007 Morales-Hojas <i>et al.</i> , 2006
16S	16S OvC	F	5'-AGCCTTAGCGTGATGGCATA -3'	McFrederick <i>et al.</i> , 2013
	16S OvB	R	5'-ACCCACATTGCATTCTTTC -3'	Krueger <i>et al.</i> , 2007 Morales-Hojas <i>et al.</i> , 2006
ND5	ND5 OvA	F	5'-TTGGTTGCCTAAGGCTATGG -3'	McFrederick <i>et al.</i> , 2013
	ND5 OvC	R	5'-CCCCTAGTAAACAACAAACCACA-3'	Krueger <i>et al.</i> , 2007 Morales-Hojas <i>et al.</i> , 2006

Dataanalys

Förekomsten av noduli per undersökt djur räknades ut, med avseende på kön respektive ålderskategori, enligt Rózsa *et al.*, 2000. Data analyserades i Minitab Express med chi-square test och P-värden räknades ut för varje analys. Även förekomsten av parasitknölar på olika lokaliseringer på hjortviltskroppen beräknades enligt figur 4.

RESULTAT

Utseende och lokalisering

Nodulär onchocercos observerades i subkutan vävnad främst dorsalt på ländrygg (96 %), men sågs även på bakdel, lår (33 %) och framben (10 %) hos de 84 infekterade individerna. Knölar var rundade, tillplattade, oregelbundna alternativt ovala till formen och varierade mellan några millimeter till ett fåtal centimeter i diameterstorlek (Bild 1a). Konsistensen på knölar var hård och fast, ytan samt snittytan var ljust gulaktig och lätt framvällande (Bild 1c). Enstaka knölar var hemorragiska och därmed mörkt röda. Solitära knölar sågs frekvent men även områden med sammanhängande parasitknölar i en utbredd lobulerad process i underhuden förekom. De trådlika parasiterna i en nodulus låg tätt sammanflätade och kunde observeras okulärt samt endast med svårighet extraheras med hjälp av en pincett (Bild 1b). Antalet knölar hos djuren redovisas under epidemiologin.

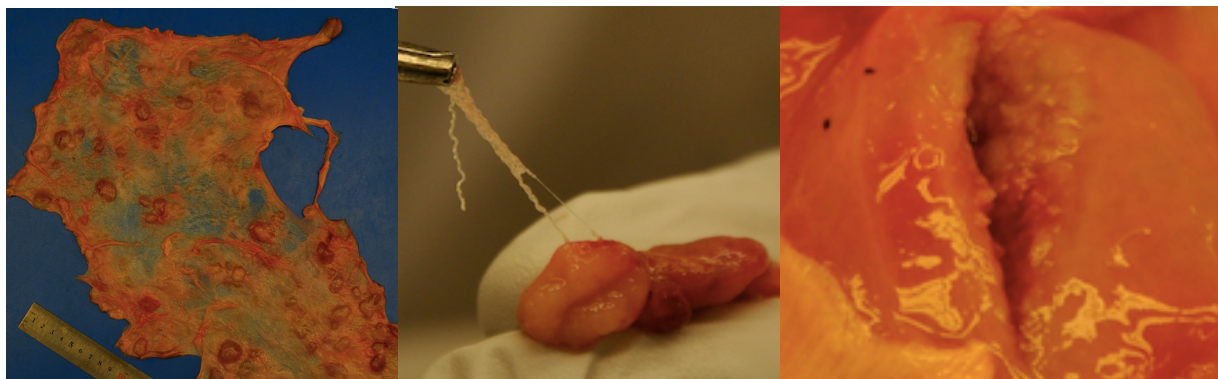


Bild 1: a) Subkutana noduli extraherade vid slakt. b) Trådlik *O. flexuosa* extraheras med pincett från noduli. c) Tvärsnitt igenom en nodulus där nystan av tätt liggande maskar ger en lätt framvällande snittyta.

Artbestämning

Sekvensering av PCR amplikon för de tre mitokondriefragmenten 12S, 16S och DN5 gav sekvenser mellan 451-517 baspar (bp). Sekvenserna var i genomsnitt 498 bp långa av genen 12S, 454 bp av genen 16S samt 451 bp av ND5. Vid jämförelse visade det sig att sekvenserna var 99-100% identiska och överensstämmande med andra sekvenser från tidigare studier av *O. flexuosa* (GenBank Accessionsnummer HQ214004, DQ523746, DQ523759 och JQ733523).

Epidemiologi

Parasiterna låg tätt packade med omkringliggande subkutan bindväv. På grund av svårighet att isolera intakta parasiter från knölna baseras prevalens och medelintensitet inte på antal parasiter per individ utan på uppskattad förekomst av antal knölar per hjort (se material och metod). Totalt ingick 151 kronvilt i studien (Tabell 3). Subkutana noduli hittades hos 56 % (84 individer) av kronviltet (Tabell 4). Majoriteten (95 %) av individerna med knölar hade mindre än 50 stycken (Tabell 5), 67 % hade mellan 1-10 stycken och 28 % hade mellan 11-50 stycken. Vuxna kronhjortar hade en signifikant ($p < 0,0001$) högre prevalens (81 %, $n=36$) än hjortvilt upp till 2 år (45 %, $n=48$). Signifikant skillnad ($p=0,0072$) sågs även för prevalensen hos handjur (48 %, $n=50$) jämfört med hondjur (72 %, $n=34$). Merparten (96%, $n=81$) av kronviltet med knölar hade dessa lokaliserade till ländryggen. Bland infekterade djur hade 31 % ($n=25$) även knölar på bakdelen (kors/lår) och 7 % ($n=6$) på ländrygg samt bakdel, bröst och framdel. Endast tre individer (4 %) hade noduliförekomst fördelat på alla lokaliseringer som registrerades (ländrygg, bakdel, bröst och brösttrygg samt framben).

Tabell 3. Antal individer i studien i ålderskategorierna kalvar, ungdjur och vuxna samt könsfördelningen i procent (%) och antal (n) i varje ålderskategori

	Antal individer i studien	Kön			
		Handjur		Hondjur	
		%	n	%	n
Kalv (<1 år)	8	38	3	62	5
Ungdjur (1-2 år)	99	79	78	21	21
Vuxna	44	53	23	47	21
Totalt	151	69	104	31	47

Tabell 4. Prevalens (% och antal) av individer, handjur samt hondjur, med infektion (subkutana knölar) i ålderskategorierna kalv, ungdjur och vuxna

	Infekterade, %	Infekterade, antal		
		Totalt	Handjur	Hondjur
Kalv (<1 år)	62	5	1	4
Ungdjur (1-2 år)	43	43	27	16
Vuxna	81	36	22	14
Totalt	56	84	50	34

Tabell 5. Fördelningen av antalet kronhjortsindivider i olika åldersgrupper i skilda intervall av antalet knölar på kroppen

	Intervall knölanttal			
	0	1-10	11-50	>51
Kalv (<1 år)	3	4	1	0
Ungdjur (1-2 år)	56	31	12	0
Vuxna	8	21	11	4
Totalt	67	56	24	4

DISKUSSION

Denna studie av förekomst och artbestämning av subkutana parasitära noduli hos kronhjort i södra tredjedelen av Sverige visar att drygt hälften av de undersökta slaktkropparna var infekterade med en parasit som med DNA-sekvensering artbestämdes till *Onchocerca flexuosa*. Näst intill samtliga (96 %) av de infekterade kronhjortarna i studien hade subkutana noduli på ländryggen och bakdel vilket överensstämmer med tidigare beskrivet utseende och lokalisation för parasiten (Bain & Schultz-Key., 1974). I studien ingick i huvudsak djur från godkända slakterianläggningar som framför allt tar emot större grupper av hägnat vilt för kommersiell försäljning men även frilevande vilt som ska gå till allmän försäljning. Materialet i studien har selekterats till främst hägnade kronhjortar. Benägenhet hos slakteripersonal att dokumentera förekomst av knölar till denna studie var, av tidsbrist och högt arbetstempo, mindre ju fler kronhjortar anläggningen hade att hantera. Slakteripersonal på flera större slakterianläggningar i södra Sverige uppskattar dock förekomsten av noduli på kronhjort som relativt stor (ej dokumenterat material, person. medd.).

I likhet med tidigare undersökningar (Hidalgo *et al.*, 2015; San-Miguel *et al.*, 2003; Santin-Durán *et al.*, 2001) visar denna studie på en signifikant skillnad i prevalens av noduli mellan vuxna (81 %) och ungdjur upp till två år (45 %). Detta kan sannolikt förklaras med att kalvar födda i maj-juni samma år som de undersöktes har varit exponerade för vektorn under kortare period jämfört med vuxna djur. Ungdjuren har därmed i mindre utsträckning än äldre individer hunnit utveckla sjukdomstecken då prepatensperioden för *O. flexuosa* är minst sex månader (Schulz-Key, 1975). Den lägre förekomsten av noduli innehållande vuxna parasiter hos yngre hjortdjur har eventuellt att göra med att yngre individer inte har lika utvecklat immunförsvar som en vuxen hjort. Yngre hjortar svarar eventuellt då mindre kraftigt på en parasitinfektion vilket leder till att knölar, som uppstår till följd av huvudvärdens reaktion mot parasiten, inte uppträder i lika stor grad som hos vuxna djur.

Till skillnad från liknande studier (Santín-Durán *et al.*, 2001; Hidalgo *et al.*, 2015) sågs en tydlig skillnad i förekomst av infektion mellan handjur (48 %) och hondjur (72 %). På grund av den ojämna könsfördelningen inom respektive ålderskategori antas det dock vara mer relevant att i första hand jämföra skillnaden i prevalens i förhållande till ålder snarare än mellan kön. Studieperioden (oktober-december) sammanfaller med tiden för utgallring av unga handjur från hägn. Unga handjur bidrar inte till aveln i hägn med en redan kapital kronhjort, varför de går till slakt innan vintern. I denna studie utgör handjuren 75 % i gruppen ungdjur men endast 22 % i kategorien vuxna. Hondjuren var däremot mer jämnt fördelade mellan de båda ålderskategorierna. I gruppen ungdjur, med en majoritet av handjur, var prevalensen av knölar signifikant lägre (45 %) än i gruppen vuxna djur (81 %). Den ojämna könsfördelningen inom och mellan de två ålderskategorierna är sannolikt förklaringen till varför prevalensen mellan hon-och handjur skiljde sig åt. Den observerade könsskillnaden beror alltså sannolikt på ålder och förklaras inte av skillnader i mottaglighet hos de båda könen.

I andra europeiska studier (Hidalgos *et al.*, 2015; Santin-Durán *et al.*, 2001) har noduliprevalens och intensitet jämförts över året. I dessa studier har det visat sig att både prevalensen och antal noduli per djur (intensiteten) var högre under höst och vinter än under de

varmare delarna av året. En årstidsvariation i noduliprevalens skulle kunna bero på inflöde av unga individer utan knölar under sommaren följt av avskjutning av äldre individer med knölar under senare delen av året. Om detta kan appliceras för kronviltet i södra Sverige vet vi inte idag. Idag finns heller ingen studie på hur länge noduli kvarstår i underhuden hos hjortdjur. Det är alltså ovisst om noduliprevalens ackumuleras över tid efter flera års parasitangrepp eller om knölar kan försvinna under en hjorts livstid. Med tanke på parasitens konstaterade överlevnad efter flera år i slutvärdet är dock avsaknad av noduli efter flera års förekomst hos individen mindre trolig.

Jämförelser av denna studie av förekomst av *O. flexuosa* är svår eftersom antalet studier med liknande frågeställning och variabler är få (Hidalgo *et al.*, 2015). Flertalet europeiska rapporter om *O. flexuosa* hos kronhjort är antingen fokuserade på morfologisk artbestämning, prevalens av antalet mikrofilarier i huden eller könsbestämning och antal av vuxna parasiter inuti nodulus. Endast enstaka studier jämför intensiteten av antal noduli per individ (Santín-Durán *et al.* San-Miguel *et al.*, 2003; Hidalgo *et al.*, 2015).

Vektorförekomsten inom ett visst område kan vara mycket varierande beroende på vegetation och närmiljö. För att vektorn ska trivas och utvecklas krävs rätt omgivningsparametrar som lämplig temperatur och fuktighet. Betydelsen av förändrade klimatbetingelser både för *Onchocerca*-arter och vektorer är stor men omfattningen är okänd. De senaste 50 åren har global uppvärmning lett till förändringar i nederbörd och fuktighet (SMHI, 2015b) vilket tillsammans med andra faktorer kan påverka parasitens förekomst och epidemiologi även i vårt svenska ekosystem. Insekternas livscykel, geografiska spridning och förmåga att fungera som biologiska vektorer kan ändras när levnadsvillkoren förändras (Hidalgo *et al.*, 2015). Hägnat kronvilt i en för vektorn naturligt fördelaktig närmiljö utsätts eventuellt i vissa fall för högre vektortäthet och smittryck jämfört med frilevande hjortar. Djurtätheten bland frilevande hjortar är sannolikt lägre och därmed inte lika fördelaktig för snabb och bred spridning av parasiten. En jämförande studie av förekomsten av nodulär onchocercos hos frilevande och hägnat hjortvilt i olika områden vore därför intressant att genomföra.

Värddjursspecificitet samt geografisk utbredning hos olika insektsvektorer för *Onchocerca*-arter är i många fall okänd (Krueger *et al.*, 2007). Bland de vektorer som överför *O. flexuosa* till kronhjort känner vi till två arter av simuliider (knott); *Prosimulium nigripes* och *Simulium ornatum* (Frank *et al.*, 1968) men indikationer finns på att *O. flexuosa* även skulle kunna utvecklas hos culicoider (svidknott). Många *Onchocerca*-arter i världen delar dock inte bara samma geografi utan har även liknande livscyklar och angriper samma värddjur. Att en mellanvärd med stor global utbredning skulle kunna angripa flera olika slutvärdar är sannolikt också förekommande. En vektor som normalt bär hovdjurspecifika *Onchocerca* men som också är blodsugande på människa skulle då kunna skapa ett plötsligt skifte av värddjur vilket därmed skulle kunna leda till utvidgad horisontell smitta av *Onchocerca* mellan olika däggdjur (Morales-Hojas, 2009). Fortsatt kartläggning av *Onchocerca*-arters geografiska utbredning i världen samt deras vektor-värd interaktioner är alltså nödvändig för att nå ökad förståelse om deras evolution och för att förebygga framtida zoonoser (Morales-Hojas, 2009).

KONKLUSION

Onchocerca-infektionens påverkan på kronhjortens hälsa är idag inte helt utredd. Att kronhjorten skulle ha fler och mer allvarliga symtom av infektion, utöver förekomst av parasit innehållande knölar i underhuden, kan dock inte uteslutas. Den höga prevalensen samt utbredningen av nodulär onchocercos orsakad av *O. flexuosa* hos svenska kronhjortar i denna studie tyder på att vektorförhållanden och miljöbetingelserna för bindvävsmaskens spridning är lämpliga i södra Sverige. För vidare studier av *O. flexuosa* i Sverige vore det intressant att jämföra förekomsten av parasiten över hela landet samt undersöka om förekomsten skiljer sig mellan frilevande vilt och hägnat. En mer ingående studie av vilken eller vilka vektorer som är mellanvärd för *O. flexuosa* skulle också vara intressant att undersöka för att få en djupare förståelse för parasitens möjliga utbredning i Sverige.

TACK

Jag vill rikta ett stort tack till mina handledare som parasiterat sig med mig under denna period; Johan Höglund för alla dina kommentarer, Henrik Uhlhorn för dina samtal på salen och ständiga uppbackning samt Erik Ågren för glada tillrop och enorm entusiasm inför artbestämningen. Tack till Arja Kautto från Livsmedelsverket som hjälpt mig sprida studien till fler mottagare. Till Moa Skarin BVF-parasitologen som tålmodigt introducerat mig till laboratoriet. Tack till all personal på vilthanteringsanläggningar, vilthägningsägare och jägare runt om i Sverige som, trots stor arbetsbelastning, bistått mig med data och delat med sig av sina värdefulla åsikter kring hjortar och allt möjligt annat. Tack till Anders Jarnemo, Jonas Malmsten, Kurt Svensson, Fredrik Eklund och Fredrik Widemo för trevliga samtal och reflektioner kring kronhjortens existens idag.

REFERENSER

Anderson, R.C. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission*. 2. ed. Wallingford: CABI Publishing.

Bain, O., Ramachandran, C., Petter, F. & Mak, J. (1977). Description of *Onchocerca dewittei* n. sp. (Filarioidea), parasite of *Sus scrofa*, in Malaysia. *Ann Parasitol. Hum Comp*, 52:471–479.

Bain, O. & Schultz-Key, H. (1974). Les *Onchocercques* du Cerf européen: Redescription d'*O. flexuosa* (Wedl, 1856) et description d'*O. tubingensis* n.sp. et *O. tarsicola* n.sp. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 25:437–449.

Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W. & Seed, J.R. (2001). *Parasitism The diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge: University Press.

Demiaszkiewicz, A.W. (1998). Prevalence of *Onchocercinae* in deer. *Magazyn Weterynaryjny*, 7:13–14.

Demiaszkiewicz, A.W. (1993). Redescription of *Onchocerca jakutensis* (Gubanov, 11964)

(Nematoda, Filarioidea). *Acta Parasitologica*, 38:124–127.

Demiaszkiewicz, A.W. & Drózd, J. (1990). The roe deer, *Capreolus capreolus* (L.) as a new host of *Onchocerca flexuosa* (Wedl.1856) (Nematoda, Filarioidea). *Acta Parasitologica Polonica*, 35:315–318.

Dikmans, G. (1933). *Onchocerca flexuosa* from the subcutaneous tissues of an antelope and subcutaneous abscesses of a deer. *Journal of Parasitology*, 19: 246.

Dudley, R. W. R., Smith, C., Dishop, M., Mirsky, D., Handler, M. H & Rao, S. (2015). A cervical spine mass caused by *Onchocerca lupi*. *The Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(14)62255-8. [2015-12-28]

Duke, B.O.L. (1971). The ecology on onchocerciasis in man and animals. in: Fallis, A. M. (ed.) *Ecology and Physiology of Parasites: A Symposium*. University of Toronto Press, Toronto; 213-222.

Dulceanu, N. & Ghitescu, F. (1986). Incidentá si unele aspecte morfopatologice in oncocercoza subcutana la cerb (*Cervus elaphus*). *Cercetari Agronomice Moldova*, 19:107–109.

Eberhard, M. L. (1979). Studies on the onchocerca (nematoda: filarioidea) found in cattle in the unites states. I. Systematics of *O. gutturosa* and *O. lienalis* with a description of *O. stilesi* sp n. *The Journal of Parasitology*, 65:379–388.

Egyed, Z., Sréter, T., Széll, Z., Beszteri, B., Oravecz, O., Márialigeti, K. & Varga, I. (2001). Morphologic and genetic characterization of *Onchocerca lupi* infecting dogs. *Veterinary Parasitology*, 102:309–319.

Frank, W., Wenki, P & Scerb, H. (1968). Untersuchungen an *Onchocerca flexuosa* (Nematoda:Filarioidea) eines Parasiten des Rothirsches *Cervus elaphus*. *Verhandlungen der Deutschen Zoologistchen Gesellschaft*, 3:540-550.

Hidalgo, M.R., Martínez, A., Carreño, R.A., González, S., Ferreras, M.C. & Díez, N. (2015). Levels of infection, pathology and nodule size of *Onchocerca flexuosa* (Nematoda: Onchocercidae) in red deer (*Cervus elaphus*) from northern Spain. *Journal of Helminthology*, 89:326–334.

Jarnemo, A. (2014). *Kronviltprojektet 2005-2013 Slutrapport*. Grimsö Forskningsstation.

Jarnemo, A. (2013). *Vilket ursprung har kronviltet i Sverige?*. Grimsö Forskningsstation.

Keddie, E.M., Higazi, T. & Unnasch, T.R. (1998). The mitochondrial genome of *Onchocerca volvulus*: sequence, structure and phylogenetic analysis. *Molecular and biochemical parasitology*, 95:111–127.

Koehsler, M., Soleiman, A., Aspöck, H., Auer, H. & Walochnik, J. (2007). *Onchocerca jakutensis* filariasis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 13:1749.

Krueger, A., Fischer, P. & Morales-Hojas, R., (2007). Molecular phylogeny of the filaria genus *Onchocerca* with special emphasis on Afrotropical human and bovine parasites. *Acta Tropica*, 101:1–14.

- McFrederick, Q.S., Haselkorn, T.S., Verocai, G.G. & Jaenike, J. (2013). Cryptic *Onchocerca* species infecting North American cervids, with implications for the evolutionary history of host associations in *Onchocerca*. *Parasitology*, 140:1201–1210.
- Morales-Hojas, R. (2009). Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 9:748–759.
- Morales-Hojas, R., Cheke, R.A. & Post, R.J. (2006). Molecular systematics of five *Onchocerca* species (Nematoda: Filarioidea) including the human parasite, *O. volvulus*, suggest sympatric speciation. *Journal of Helminthology*, 80:281-290.
- Morandi, F., Krueger, A., Panarese, S., Sarli, G., Verin, R., Nicoloso, S., Benazzi, C. & Galuppi, R. (2011). First Description of Nodular Onchocercosis (*Onchocerca jakutensis*) in Free-ranging Italian Red Deer (*Cervus elaphus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 47:963–967.
- Muller, R. (1979). Identification of *Onchocerca*. I: Taylor, A. E. R & Muller, R. (red). *Identification of Parasites and Their Vectors- 17 th Symposium of the British Society for Parasitology*. Oxford: Blackwell, 175-206.
- Nelson, G.S. (1970). Onchocerciasis. *Adv Parasitol*, 8:173-224.
- Nobelprize.org (2015-10-05). *The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Press Release*. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/press.html [2015-10-11].
- Orihel, T. C & Eberhard, M. L. (1988). Zoonotic Filariasis. *Clinical Microbiology Review*, 2:366-381.
- Otranto, D & Eberhard, M.L. (2011). Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasites & Vectors*, 4:41, doi: 10.1186/1756-3305-4-41. [2015-12-17].
- Páv, J. & Zajíček, D. (1981). Health conditions of ungulates in the region with air pollution. *Práce VULHM*, 58:213–228.
- Plenge-Bönig, A., Krömer, M. & Büttner, D.W. (1995). Light and electron microscopy studies on *Onchocerca jakutensis* and *O. flexuosa* of red deer show different host-parasite interactions. *Parasitology research*, 81:66–73.
- Roberts, J.M.D., Neumann, E., Göckel, C.W. & Highton, R.B. (1967). Onchocerciasis in Kenya 9, 11 and 18 years after elimination of the vector. *Bull World Health Organ*, 37:195–212.
- San-Miguel, J.M., Álvarez, G., Rodríguez-Vigal, C. & Luzón, M. (2003). Nodular onchocercosis of red deer in central Spain. *Veterinary Parasitology*, 114:75–79.
- Santín-Durán, M., Alunda, J.M., de la Fuente, C. & Hoberg, E.P. (2001). Onchocercosis in Red Deer (*Cervus elaphus*) From Spain. *Journal of Parasitology*, 87:1213–1215.

Schulz-Key, H. (1975). Untersuchungen über die Filarien der Cerviden in Süddeutschland. 2. Die Filarien des Rothirsches (*Cervus elaphus*). *Tropenmedizin und Parasitologie*, 26: 348–358.

Schulz-Key, H., Bain, O. & Wenk, P. (1976). Untersuchungen über die Filarien der Cerviden in Süddeutschland. 4. *Onchocerca garmsi* Bain und Schulz-Key, 1976, eine subkutane Filarie des Rothirsches (*Cervus elaphus*). *Tropenmedizin und Parasitologie*, 27:229–232.

Shimalov, V.V. & Shimalov, V.T. (2003). Helminth fauna of cervids in Belorussian Polesie. *Parasitology Research*, 89:75–76.

SMHI (2015.06.08). Sveriges klimat: Sveriges. Meteorologiska Och Hydrologiska Institut <http://www.smhi.se/kunskapsbanken/klimat/sveriges-klimat-1.6867> [2015.11.19].

SMHI (2015.09.01). Klimat förändras- vi formar vår framtid, klimatspecial. *Medvind SMHI*, 3. http://www.smhi.se/polopoly_fs/1.94054!/Menu/general/extGroup/attachmentColHold/mainContent11/file/Medvind_nr3_2015_150921.pdf [2015.12.17].

Svenska Jägareförbundet (2012-11-21). Kronhjortens population. <http://jagareforbundet.se/vilt/vilt-vetande/artpresentation/daggdjur/kronhjort> [2015.10.04].

Takaoka, H., Bain, O., Korenaga, M., Kozek, W., Shirasaka, C., Aoki, C., Otsuka, Y., Fukuda, M., Eshita, Y. & Daa, T. (2004). Zoonotic onchocerciasis caused by a parasite from wild boar in Oita, Japan. A comprehensive analysis of morphological characteristics of the worms for its diagnosis. *Parasite*, 11:285–292.

Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*. 3. ed. Victoria Australia: Blackwell publishing Ltd.

Uni, S., Bain, O., Agatsuma, T., Harada, M., Torii, H., Fukuda, M. & Takaoka, H. (2007). *Onchocerca eberhardi* n. sp. (Nematoda: Filarioidea) from sika deer in Japan; relationships between species parasitic in cervids and bovids in the Holarctic region. *Parasite*, 11: 199–211.

World Health Organization (2015-03-01). Onchocerciasis <http://www.who.int/Mediacentre/Factsheets/Onchocerciasis> [2015-10-18].

World Health Organization (2016-01-01). Ivermectin <http://www.who.int/apoc/cdti/ivermectin/en/> [2016-01-10].

Wildenburg, G., Plenge-Bönig, A., Renz, A., Fischer, P. & Büttner, D.W. (1997). Distribution of mast cells and their correlation with inflammatory cells around *Onchocerca gutturosa*, *O. tarsicola*, *O. ochengi*, and *O. flexuosa*. *Parasitology Research*, 83:109–120.

Zhelizniak, P. (2003). New species filaria (Spirurida Onchocercidae) in fauna of Ukraine. *Vestnik Zoologii*, 37:73–75.

Appendix 1: Extraktion av DNA enligt NucleoSpin® Tissue protokoll

1. Provförberedelse

Samlingsröret med volym om 25 µL innehållande 70 % sprit och cirka 25 mg parasitmaterial centrifugerades. Spriten separerades därefter från samlingsröret. Samlingsröret med sedimenterat parasitmaterial stod sedan utan lock för att låta den sista alkoholen avdunsta.

2. Pre lys

180 µL Buffert T1 samt 25 µL Proteinase K lösning tillfördes till samlingsröret och blandades sedan under vortex. Viktigt var att hela provet var täckt av lösningen. Sedan inkuberades lösningen under samtidig blandning vid 56 °C över natten för att Proteinase K skulle kunna lysa cellbindningarna.

3. Lysering

Provet blandades i vortex. 200 µL Buffert B3 tillsattes och blandades med vortex under inkubering i 70 °C i 10 minuter.

4. Anpassa DNA-bindande förhållanden

210 µL 96 % etanol tillfördes till lösningen och blandades sedan med vortex under snabb hastighet.

5. Binda DNA

Inuti varje samlingsrör placerades en kolumn (NucleoSpin® Tissue column). Lösningen med material pipetterades till kolumnen och centrifugerades sedan under 1 minut och 11 000 * rcf (relativa centrifugalkraften=g). Genom tillsatser av salter och etanol skapades en kemisk miljö där DNA band till kolumnens membran under centrifugering medan överskottet filtrerades bort. Efter centrifugering slängdes samlingsröret och kolumnen med parasit DNA placerades inuti ett nytt samlingsrör.

6. Tvätta DNA

Tvättning av DNA provet gjordes 2 gånger för att undvika kontamination av främmande DNA och oönskade partiklar. I första tvätten tillsattes 500µL BW buffert. Provet centrifugerades sedan under 1 minut och 11 000 * rcf. Filtrerad vätska slängdes bort och kolumnen placerades i tomt samlingsrör. I andra tvätten tillsattes 600 µL B5 buffert. Provet centrifugerades och filtrerades enligt ovan och placerades tillbaka i tomt samlingsrör. För att filtrera ur kvarvarande alkohol centrifugerades samlingsröret utan någon tillförd buffert i 1 minut i 11 000 * rcf.

7. Eluera rent DNA

Kolumnen med tvättat DNA placerades sedan i ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugeringsrör och 50 µL BE buffert tillfördes. Provet inkuberades under 3 minuter vid rumstemperatur och centrifugerades sedan under 1 minut och 11 000 * rcf. BE buffert löste upp och möjliggjorde filtrering av genomiskt renat DNA. För möjlighet till ytterligare extraktion av en större mängd DNA upprepas proceduren ytterligare en gång. Detta var en modifiering av NucleoSpin® Tissue protokolls instruktioner. Extraherad DNA förvarades sedan i märkt mikrocentrifugeringsrör i frys inför PCR.

Appendix 2: Metod för parasitär analys och artbestämning

PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) används för att uppföröka (amplifiera) specifika DNA fragment som senare användes för molekylär karaktärisering genom sekvensering. Reaktionen sker exponentiellt genom upprepade termiska cykler av denaturering, hybridisering (inbindning) och enzymatisk replikering.

Förutsättningar

Vid PCR analys krävs följande komponenter:

- DNA-templat: del av DNA med den önskade målregionen som ska amplificeras.
- Ett primerpar (Forward och Reverse): DNA oligonukleotider som binder in till önskad målregion på enkelsträngat DNA och är komplementära till 3' ändarna på den kodande (sense) och icke-kodande (antisense) strängen i DNA-templatet. Primerparen reglerar vart syntesen av DNA polymeraset ska starta och sluta.
- dNTP: nukleotider, innehållande en trifosfatgrupp. Byggstenarna vid syntesen av nytt DNA.
- DNA-polymeras: enzym som medverkar i DNA-syntesen genom att bygga en komplementär DNA-sträng utifrån nukleotider (dNTP). Primrarna visar polymeraset vart startpunkt och syntes av DNA ska börja. I denna PCR användes AmpliTag gold som är ett värmestabilt enzym med ett temperaturoptimum på 70 grader. Buffertlösning: skapar passande kemisk miljö för att DNA-polymeraset ska syntetisera DNA under optimala förhållanden.
- MgCl₂ lösning: bidrar, liksom bufferten, till att skapa rätt kemiska miljö för att DNA-replikeringen ska kunna äga rum.

I denna studie PCR-amplifierades tre gensekvenser från mitokondriens DNA (mDNA). För ändamålet användes tre specifika primerpar varav två av dessa binder till rRNA generna 12S och 16S medan ett par binder till genen för NADH dehydrogenas 5 (ND5).

PCR reaktionen utfördes i en total volym av 25µl innehållande 1x buffert, 3mM MgCl₂, 200 µM av varje dNTP, 0,2 µM av respektive primerpar (Forward och Reverse), 1 enhet AmpliTag gold och 2 µl av extraherat DNA.

Negativa kontroller för PCR (reaktionen saknar DNA från parasit och innehåller istället vatten) kördes parallellt för att försäkra att reaktionerna var riktiga.

Tillvägagångssätt

- PCR-reaktionen initieras när reaktionslösningen med reaktions ingredienser hettas upp. Detta görs eftersom DNA-polymeraset kräver värme för aktivering.
- PCR-reaktionen består sedan av flera, vanligen 20-40 stycken, upprepade temperaturcykler där varje cykel omfattar tre separerade temperatursteg. Temperaturen och tiden som används i varje cykel beror på typ av DNA-polymeras, koncentration av joner och nukleotider men även andra faktorer.

- Denaturering: dvs upphettning till 94-98°C grader. Vätebindningarna mellan komplementära baser i DNA-strängarna bryts och öppnar upp DNAt vilket ger två enkelsträngade DNA-templat.
- Hybridisering: dvs lokalisering av primerpar och inbindning till målsekvensen i det enkelsträngade DNAt. Temperaturen sänks till ca 50-60°C under detta steg för att primers ska kunna binda in specifikt till överensstämmande templatsekvens i mål DNAt. Om temperaturen är för låg binder de inte längre in specifikt. Detta steg varade i 20-60 sekunder.
- Enzymatisk replikering: det vill säga syntetisering av nytt DNA med hjälp av DNA-polymeras och nukleotider. DNA-kedjan som bildas är komplementär till det DNA-templat som primerparen fäster till. Temperaturen stiger under detta steg igen till ett optimum för det polymeras som används, vanligen kring 70-80°C. Tiden som krävs i detta steg beror på typ av polymeras samt längden på sekvens som amplifieras.
- Slutgiltig förlängning: säkerställer att allt enkelsträngat DNA förlängs av polymeraset fullt ut efter den sista termocykeln.

I denna studie bestod amplifieringen av ett denaturerande steg vid 94°C i 3 minuter följt av 35 stycken termiska cykler om 94°C i 45 sekunder, 50°C i 1 minut och sist 72°C i 30 sekunder följt av ett sista förlängande steg på 72°C i 5 minuter.

Gelelektrofores

För att kontrollera att PCR-amplifieringen genererade DNA fragment av förväntad storlek separerades PCR-produkten först genom gelelektrofores på en agarosgel. Gelelektrofores bygger på att makromolekyler av varierande storlek rör sig olika snabbt i gelen under inverkan av ett elektriskt fält. Hastigheten, och därmed sträckan molekylerna hinner vandra i gelen, beror alltså på DNA-fragmentens laddning, storlek och massa. Gelen gör det möjligt att separera olika nukleinsyror från varandra där de mindre negativt laddade makromolekylerna tar sig längre ut i gelen, närmare pluspolen, än de större molekylerna.

I denna studie genomfördes gelelektroforesen med en 1 % agar lösning och DNA påvisades med uv-ljus.

Sekvensering

För molekylär identifiering av parasiten krävs sekvensering av de framtagna DNA-fragmenten. DNA-sekvensering är en metod som fastställer i vilken ordning nukleotiderna (kvävebaserna adenin, guanin, cytosin och tymin) förekommer i DNAt.

PCR proverna, amplikonerna, skickades till Macrogen Inc i Amsterdam för standard sekvensering. Slutligen, jämfördes erhållna sekvenser med befintliga sekvenser lagrade i databasen GenBank med hjälp av BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

I denna studie var sekvenserna 99-100% identiska med andra sekvenser från tidigare studier av *O. flexuosa* (GenBank Accessionsnummer HQ214004, DQ523746, DQ523759 och JQ733523).

