

Fästingar och fästingburna infektioner hos årslamm i olika klimatzoner

Bakgrund

Betesgående får går ofta på naturbeten, marker de delar med vilda djurslag och deras parasiter. Fästingar och fästingburna infektioner, framförallt den rickettsie-liknande bakterien *Anaplasma phagocytophilum* (*Ap*), orsakar sjukdomen anaplasmos (betesfeber) som drabbar främst lamm har uppmärksammas på senare tid i form av ökande problem med ledbesvär, förstörade lymfkörtlar och ibland även dödsfall bland årslamm. Denna intracellulära bakterie infekterar främst olika leukocyter. Under den akuta fasen blir årslammens immunförsvar kraftigt försvagat vilket kan bana väg för andra infektioner, såsom lung- och ledinflammation eller blodförgiftning. Infektionen kan ha ett mycket snabbt förlopp vilket medför att man inte alltid hinner behandla drabbade djur som kan dö inom något dygn. Andra djurslag kan också infekteras av *Ap* däribland häst, nötkreatur, hund, katt och människa.

Ett tidigare SLF-finansierat tvåårigt projekt på Gotland visade att de tilltagande problemen av betesfeber inte berodde på resistens hos fästingarna mot de bekämpningsmedel som används i den fästingprofylax som då rekommenderades. Mängden fästingar uppvisade dock stora skillnader mellan åren. Tydliga samband mellan andelen infekterade fästingar och antalet fall av betesfeber hos lamm kunde inte påvisas.

Den dominerande och mest geografiskt utbredda fästingen i landet, *Ixodes ricinus*, allmän fästing, har ett brett värdspektrum vilket gör den till en effektiv smittspridare, vektor, för samtliga i landet förekommande fästingburna smittor, t ex *Babesia divergens*, en protozo som förökar sig i de röda blodkropparna hos nötkreatur och orsakar babesios eller sommarsjuka, TBE-virus (Haglund, 2002), *Francisella tularensis* (Mörner, 1994) och *Borrelia* spp (Tälleklint & Jaenson, 1994). Under senare år har även bakterien *Rickettsia helvetica* samt närbesläktade arter påträffats hos fästingar i Sverige. Hos människa kan des sistnämnda ge upphov till liknande symtom som borrelios. Det är dock okänt hur eller om denna bakterie påverkar olika vilda eller domesticerade djur. Under projektiden har även en för landet ny fästingburna bakterie påvisats, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (Andersson & Råberg, 2011). Dess förmåga att framkalla sjukdom är i dagsläget okänd. I Sverige har 13 olika arter av fästingar påvisats. Av dessa var merparten 3-värdsfästingar, dvs de olika utvecklingsstadierna, larv, nymf och adult parasiterar olika värdar. Detta medför en effektiv spridning av smittämnen från t ex gnagarpopulationer till storvilt, domesticerade djur samt människa. Fästingen *Haemaphysalis punctata*, vars främsta utbredningsområde omfattar Öland och Gotland, överensstämmer med områden där merparten av de beskrivna problemen med ledbesvär och ökad dödlighet på årslamm har observerats. Enstaka fynd av *H. punctata* har även påvisats på sydöstra fastlandet (Malmsten & Chirico, opubl. data). Denna fästings utbredning i landet är dock ofullständigt utredd. Preliminära data tyder på att *H. punctata* kan spela en viktig roll som spridare av *Ap* hos älg på Öland (Malmsten & Chirico, 2008).

Sedan länge har det på Gotland rekommenderats fästingprofylax i början av betesperioden som förebyggande åtgärd i form av rutinmässig behandling med läkemedel eller handelspreparat, akaricider, innehållande organofosfater (OP) eller syntetiska pyretroider. Denna rekommendation har spridit sig till fastlandets fårbesättningar som en följd av information kring problematiken med betesfeber som kommit ut i och med det föregående (Kött V0650130) och föreliggande SLFprojektet kring fästingburna smittor hos får. Numera finns det endast tre läkemedel, med syntetiska pyretroider som aktiv substans, tillgängliga i Sverige.

Allt eftersom problematiken med anaplasmos uppmärksammades ökade förfrågningar rörande sjukdomen och vid analys av blodprover uppdagades att betesfeber även är väl spridd på fastlandet. I stickprov från beten i södra Sverige med dokumenterade fall av betesfeber kunde även *Ap* påvisas i upp till 50 % av insamlade fästingar. De flesta studier av fästingburna infektioner genomförs där det finns uttalade problem och omfattar då tyvärr endast ett begränsat område med få provtagningar. Data utifrån sådana studier kan liknas vid ögonblicksbilder och kommer att utgöra en grund för rekommendationer gällande förebyggande åtgärder som t ex, fästingprofylax. Detta kan vara relevant för lokala regioner med överensstämmande klimat, fauna och vegetationstyper. Då inga systematiska studier har genomförts där man fastställer eventuella skillnader i populationer av fästingar, deras artsammansättning och uppträdandet av fästingburna smittor i landets olika klimatzoner på ett övergripande sätt ansökte vi om detta projekt med fokus på en landsomfattande studie av fästingar, *Ap*infektioner och hur betesdjur påverkas av dem.

Projektets ursprungsansökan reviderades eftersom de ansökta projektmedlen reducerades med 66% med motiveringen, "Projektet beviljas medel för att besvara de frågor som är angelägna för lammproduktionen. Förutsättningen är att fokus ska ligga på fåren och koncentreras till de områden i landet där problemen är störst", varvid "en till det beslutade beloppet anpassad projektplan" bifogades och godkändes. I och med de särskilda villkoren ställda på projektet där problem hos får var styrande istället för, som ursprungligen tänkt, smittspridning inom olika klimatzoner, utfördes endast en jämförelse av sjukdomsfall och *Ap*infektion inom olika klimatzoner.

Material och metoder

I syfte att ringa in problemområden i landet identifierades för projektet lämpliga besättningar med hjälp av Svenska Djurhälsovårdens färhälsoveterinärer. Tolv besättningar i Skåne (2 st, BP; EG), Bohuslän (2 st, AND; HBA), Småland (3 st, AR; IMB; IG), Västergötland (1 st, KG), Östergötland (2 st, EA; CL) och Uppland (2 st i Stockholms norra skärgård, CS; FH) specialstuderades under 2010, där under året uppkomna fall av anaplasmos hos lamm analyserades samt att frilevande fästingar på betet insamlades varannan vecka under maj till och med september med flaggning (Mejlon & Jaenson, 1993) för att identifieras till art och utvecklingsstadium. Även dessa analyserades med avseende på *Ap*infektion med en RealtidsPCR (Polymeras Chain Reaction) där förekomst av nukleinsyra från *Ap* påvisades. Utöver detta fastställdes smittämnet typ/grupptillhörighet i fynd hos lamm och fästingar för att i senare skede utvärdera huruvida vissa typer av *Ap* var likvärdigt förekommande i sjukdomsfall hos lamm och fästingar, deras utbredning och om någon av typerna verkar vara mer sjukdomsframkallande.

Flaggningen utfördes av djurägarna på fyra förutbestämda sektorer på vardera ca 100 m² av varje bete. Innan första provtagning instruerades provtagarna rörande flaggningstekniken och rutiner etablerades för att skicka in fästingprov. Dessutom fastställdes rutiner för tillvägagångssätt om lamm visade symtom på anaplasmos, d v s tillkalla veterinär för att ta blodprov, vid dödsfall antingen skicka hela djuret för obduktion, alternativt ta ur mjälte som skickades till SVA enligt särskild rutin för analys och karaktärisering med ovan nämnd PCR-diagnostik. Vid fynd av *Ap* från sjukdomsfall hos lamm och från fästingar genomfördes alltså släktskapsstudier i syfte att jämföra fall från infekterade djur och fästingar för att se om gensekvenser från dessa överensstämmer genom att sekvensera tre *Ap*gener, 16s rRNA, anka och groESL, så kallad molekylär epidemiologi.

Även under 2011, studerades tolv besättningar i Skåne (2 st, BP; EG), Halland (2 st, CS; XX), Småland (3 st, AR; IMB; IG), Västergötland (1 st, KG), Östergötland (2 st, EA; CL) och

Stockholms skärgård, Uppland (2 st se nedan, CS1; CS2). I Stockholms skärgård genomfördes årets studie på en och samma besättning där djuren fördelades på två öar och betraktades som två skilda besättningar i studien. Då en mycket sparsam fästingförekomst uppvisades i de båda besättningarna i Bohuslän under 2010 ersattes dessa med två besättningar belägna i Halland med tidigare historik av betesfeber. För att optimera fästinginsamlingen genomfördes en betesbesiktning av samtliga beten innan betessläpp 2011 där gynnsamma fästinghabitat identifierades och provtagning skulle utföras.

Under 2012 valdes sex besättningar ut för att studeras. Dessa valdes på grundval att de under de två första åren uppvisat förekomst av sjukdomsfall, alternativt mest förekomst av *Ap* i fästingar samt under förutsättning att insamlingar tidigare hade genomförts systematiskt, det vill säga regelbundet. Detta för att undvika den stora årsvariation som uppvisades under projektets två första år. 2012-års studie kom därför att omfatta besättningen i Stockholms skärgård (CS1; CS2; CS3) nu fördelad på tre öar, samt en besättning i Östergötland (EA) och två besättningar i Småland (IMB; AR).

DNA från enskilda fästingar och från mjältar eller blodprover från drabbade lamm extraherades och analyserades med real-tids PCR för *Ap* enligt Jäderlund m. fl. (2009). Pooler med 50 fästinglarver krävdes dock för att få ut tillräckligt med nukleinsyra till analysen. För prover som visade sig innehålla *Ap* användes sekvensering att särskilja olika varianter av bakterien där generna 16s rRNA, *groESL* och *ankA* amplifierades varpå PCR-produkterna sekvenserades enligt Franzén m. fl. (2005). Sekvenserna analyserades med hjälp av programvaran CLC workbench (6.6.2, CLC Bio, QiaGen), och jämfördes med andra sekvenser från samma gener publicerade i GenBank (National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda MD, USA, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En mer detaljerad redovisning av tillvägagångssätt av det molekylära arbetet angående vilka protokoll som följts samt vilka primrar som använts kan på begäran skickas in som en separat bilaga till rapporten.

Resultat

Totalt insamlades 1732 fästingar under projektiden (2010 = 517; 2011 = 485; 2012 = 730). Av dessa analyserades 333; 357 samt 730 fästingar under de tre åren.

Under 2010 inkom fästingar från 11 av de 12 utvalda besättningarna. Fyra av besättningarna uppvisade infekterade fästingar med följande fördelning CS, 14%; AND 13%, AR 13% och IMB 17%. Infektionerna fanns i fästingar fångade under juli till september, inga prover inkom dock i maj.

Även under 2011 inkom fästingar från 11 av de 12 besättningarna där andelen infekterade fästingar fördelades enligt följande: CS1, 6% och AR, 13%. Infektionerna fördelade sig över hela betessäsongen detta år.

Slutligen 2012 inkom fästingar från 5 av de 6 besättningarna där andelen infekterade fästingar fördelades enligt följande: CS1, 23%; CS3, 6%, AR, 3% och EA 13%. Även detta år fördelade infektionerna sig över hela betessäsongen, inga fästingar inkom dock under maj.

Anmärkningsvärt var att alla fästingfynd utgjordes av en art, *I. ricinus*!

Vi kunde inte finna några samband i fästingförekomst eller *Ap*infektion i vare sig fästingar eller i analyserade fall från de fyra klimatzonerna studien kom att omfatta.

Trots att insamling utfördes i optimala fästinghabitat blev årsvariationen påtaglig. Dessutom uteblev fästingprover helt eller till stor del från vissa besättningar vilket omöjliggjorde

parjämförelse av besättningar inom landskapen över tid och över år. Flest antal fästingar per besättning insamlades under sista året, trots att en besättning inte skickade några prover alls, vilket pekar på svårigheten att med denna typ av studie täcka in så stora områden som möjligt och samtidigt få in tillräckligt med data.

Av de *Appositiva* fästingproverna gav endast åtta prover läsbara 16s rRNA sekvenser. De allra flesta proverna innehöll flera olika 16s rRNA sekvenser, vilket visar att fästingarna varit infekterade med två eller flera olika bakteriearter samtidigt. För den gen som anses ge den högsta diversiteten mellan varianter av *Ap*, *ankA*, fick endast tolv prover läsbara sekvenser. Majoriteten av resterande prover gav ingen produkt med de PCR primrar som användes. Detta tyder på att det finns en variation i vårt material och vi skulle därför behöva undersöka detta med alternativa PCR primrar för att bättre karakterisera huruvida olika typer av *Ap* förekommer i dessa fall. För *groESL* genen kunde 29 av fästingarnas och lammens sekvenser analyseras och jämföras med varandra.

Även årsvariationen i antalet sjukdomsfall var påtaglig och därmed svårtolkad. Inga fall av anaplasmos inrapporterades under 2010 och 2012. Under 2011 har totalt 11 blodprov och ett organprov skickats in för analys. Sex av blodproven var tagna under juni. Resterande blodprov samt organprovet (dödsfall) togs i augusti. I proven från juni uppvisade fem av sex djur, infektion med *Ap*. I fyra av dessa fall visade det sig att lammen inte fått någon fästingprofylax innan betessläpp. Organprovet från augusti innehöll *Ap*. Obduktionsresultatet visade dock att djuret även hade andra parasit- och bakterie infektioner som kan ha orsakat dess död. Blodproven från augustifallen var i samtliga fall negativa på PCR. Ytterligare två positiva fall från 2011 från två olika lokaler (CS1; EA) inkom. Utifrån dessa fick vi endast bra sekvenser från *groESL* varvid vi grupperade *Ap* med hjälp av denna gen. I Fig 1 finns de 26 proverna från positiva fästingar och dessa två fall, samt sekvenser från två *Ap*infekterade svenska hästar, sekvenser från två svenska älgar och sekvenser från ett franskt får och en fransk ko (EU860088 & EU860091, Genbank). I det ena fallet, CS1, har det sjuka lammet samma sekvens som isolerades från fästingar fångade på CS, men i det andra fallet (EA) har lammet en sekvens som matchar *Ap*sekvenser som återfanns hos fästingar insamlade från besättningarna CS under 2010 och AR under alla åren (Fig 1). Proven från den franska kon och fåret hamnar nära våra svenska fästingprover, liksom de svenska hästarna. Av de två svenska älgarna (Malmsten m. fl., 2014) är den ena (KC800986) mycket närliggande fästingproverna, medan den andra (KC800084) skiljer sig mycket från alla andra analyserade prover (Fig 1).

När vi jämför de tolv *ankA* sekvenser vi kunde använda från vårt material, framgår det att en viss diversitet finns mellan *Ap* i fästingar, detta avspeglar en variation såväl inom som mellan besättningarnas fästingpopulationer på betet över de tre åren (Fig 3). De två sekvenser som kommer från två *Ap*infekterade hästar (Franzén m. fl., 2005), skiljer sig från *Ap* isolerade i våra fästingar. När vi jämför sekvenserna med de som publicerats av Huhn m. fl. (2014) bildar våra fästingars *Ap* en egen grupp och det också framgår tydligt att de två svenska hästarna ingår i ett annat kluster än de vi finner i vår studie (Fig 2 och 3).

Diskussion

Då projektet justerades enligt SLFs direktiv ” Förutsättningen är att fokus ska ligga på fåren och koncentreras till de områden i landet där problemen är störst” resulterade detta i att vi under de två första åren identifierade var någonstans på fastlandet problembesättningar fanns och sedan studera fall där *Ap*infektioner identifierades hos lamm. Tyvärr kunde vi inte alltid konfirmera förekomst av *Ap* i fästingprover och sjukdomsfall i de utvalda

försöksbesättningarna. Även under det sista året då besättningar med sjukdomsfall och där systematisk insamling av fästingar tidigare hade dokumenterats, uteblev *Ap*-fallen. Därför blir det mycket svårt att dra några slutsatser baserat på förekomsten av *Ap*-infekterade fästingar som varierade mellan 3 och 23% på maximalt 4 besättnings beten per år. Däremot är all information framtagen i projektet ny data för landet då det tidigare systematiskt studerats endast på Gotland (Kött V0650130).

Att fästingprofylax är essentiellt innan betesläpp var otvetydigt. Även om en studie (Gustafsson m. fl., 2014) har visat att noggrann fästingprofylax med pour-on preparat inte ger ett fullständigt skydd mot *Ap*. Däremot kan det tänkas att lammen blir utsatta för en ”moderat” smittdos som gör att de bygger upp ett immunförsvar som gör dem motståndskraftiga framöver. Detta kan förklara att vi inte ser sjukdomsfall senare på betessäsongen även om smittan finns hos fästingar ända fram till september.

Den molekylära karaktäriseringen av *Ap*-infektion i fästingar och från sjukdomsfall gav inga entydiga svar då det fanns både variationer inom fästingar funna på samma bete samt mellan olika besättnings beten samt att det varierade över de tre åren. Liknande variation fanns i sjukdomsfall hos lamm och fästingar, utom i ett fall (CS1). Likväl verkar *A*-typerna vi isolerat vara mer närbesläktade med varandra än med de rapporterade i andra studier. Detta kan bero på att denna studie är fokuserad på får och fästingar på fårbeten och därmed skiljer ut de stammar som hör till detta djurslag. Proteinet som *ankA*-genen kodar för är troligen en virulensfaktor som gör det möjligt för oss att gå vidare genom att studera om våra isolat är ”får*Ap*-isolat” i Sverige och kanske mer skadliga för just får än för andra djurslag.

Huhn m. fl. (2014) använde flera metoder för att särskilja olika typer *Ap* (16s rRNA sekvensering, Multi Locus Sequence Typing MLST (MLST) och *ankA* sekvensering). De menar att med dessa metoder, framför allt med MLST, kan man se att bakterien både kan vara klonal, dvs att en stam sprider sig mellan olika geografiska regioner och även mellan olika värdjur, främst mellan häst, hund, katt, igelkott och människa. För idisslare är bilden mer splittrad, där flera olika varianter ses både hos olika djurslag och olika utbredningsområden. Fästingar visar sig kunna bära på flera olika typer *Ap* (Huhn m. fl., 2014). *Ixodes ricinus*, en trevärdsfästing som inte har någon värdpreferens gör den därför särskilt effektiv till att sprida smittor mellan olika typer av värdjur. Då *I. ricinus* var den enda fästing som förekom i studien är risken överhängande att *Ap* från olika idisslare kan överföras till lamm och orsaka skada i lammproduktionen inom fästingens utbredningsområde.

Referenser

- Andersson M, & Råberg L. 2011. Wild rodents and novel human pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, southern Sweden. *Emerging Infectious Diseases*. 17, 1716-1718.
- Franzén P, Aspán, A, Egenvall A, Gunnarsson A, Åberg L & Pringle J. 2005. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 232-239.
- Gustafsson K, Chirico J & Engström F. 2014. Fästingar sprider smitta till lamm på bete. *Fårskötsel*, 3, 38-41.
- Haglund M. 2002. Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an International study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *International Journal of Medical Microbiology*. 33, 50-54.
- Huhn C, Winter C, Wolfspurger T, Wüppenhorst N, Strašek Smrdel K, Skuballa J, Pfäffle M, Petney T, Silaghi C, Dyachenko V, Pantchev N, Straubinger RK, Schaarschmidt-Kiener D, Ganter M, Aardema ML & von Loewenich FD. 2014. Analysis of the population structure of

Anaplasma phagocytophilum using multilocus sequence typing. PLoS One. 2014 Apr 3;9(4):e93725.

Jäderlund KH, Bergström K, Egenvall A & Hedhammar A. 2009. Cerebrospinal fluid PCR and antibody concentrations against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs with neurological signs. Journal of Veterinary Internal Medicine.;23, 669-672.

Malmsten J, Widén DG, Rydevik G, Yon L, Hutchings MR, Thulin CG, Söderquist L, Aspan A, Stuen S & Dalin AM. 2014. Temporal and spatial variation in *Anaplasma phagocytophilum* infection in Swedish moose (*Alces alces*). Epidemiology and Infection. Jun;142(6):1205-13. doi: 10.1017/S0950268813002094. Epub 2013 Sep 4.

Malmsten, J., Chirico, J. 2008. Red sheep tick (*Haemaphysalis punctata*) in Scandinavian moose (*Alces alces*). Proc. 8th Conference of the European Wildlife Disease Association, <http://www.ewda.org>, 57.

Mörner, T. 1994. The ecology of tularaemia. Revue Scientifique et Technique, International Office of Epizootics. 11, 1123-1130.

Tälleklint, L. & Jaenson, T.G.T. 1994. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Sweden. Journal of Medical Entomology. 31, 880-886.

Publikationer

Resultaten från studien förväntas kunna ge upphov till minst 2 – 3 vetenskapliga publikationer under det närmaste året.

Slutsatser

Det framkom entydigt att om man inte behandlade lamm med pour-on preparat enligt rekommendation, innan betessläpp, upprepad behandling var tredje vecka fram till midsommar, insjuknade djuren förutsatt att *Ap*infekterade fästingar finns på betet. Då djurägare ofta känner till om beten är ”problembeten” med avseende på *Ap*, skall man inte tveka att behandla. Om man tar nya beten i anspråk kan man mycket enkelt ta reda på om det innehåller fästingar genom att dra en fästingflagga på betet och skicka fästingar för analys. Denna service beräknas finnas på bl a SVA fr o m 2015.

Resultatförmedling/informationsspridning

Under hela projektperioden har djurägare och veterinärer uppmärksammats med information såväl från SVA som Svenska Djurhälsovården via hemsidorna www.sva.se samt www.sdhy.se och informationstidskrifterna SVAvet och Djurhälsonytt samt Fårskötsel om projektet och dess frågeställningar.

Projektet har presenterats vid ett flertal tillfällen under 2010:

1. 18 mars, Svenska Djurhälsovårdens vårkonferens, Djurönäset, *Anaplasma* på får på Gotland – Bakgrund och utveckling
2. 5 maj, Sveriges Nätverk för Fästingforskare, Vadstena Klosterhotel, Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* in different climate zones
3. 7 maj, Fästingar och deras följder för lammproducenter på Gotland, Länsstyrelsen Gotlands län, Gotlands Fåravelsförening, Europeiska jordbruksfonden för lantbruksutveckling. Lövsta, Romakloster

Och vid två tillfällen 2011:

1. 23 mars, vid SLUs öppna seminarier i Parasitologi, 23 mars.
2. 25 augusti, vid den 23e konferensen för World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology (WAAVP), Buenos Aires, 21 – 25 augusti, 2011.

Slutligen 2013:

1. 18 – 22 februari, poster på den 8e International Sheep Veterinary Congress, Rotorua, Nya Zeeland.

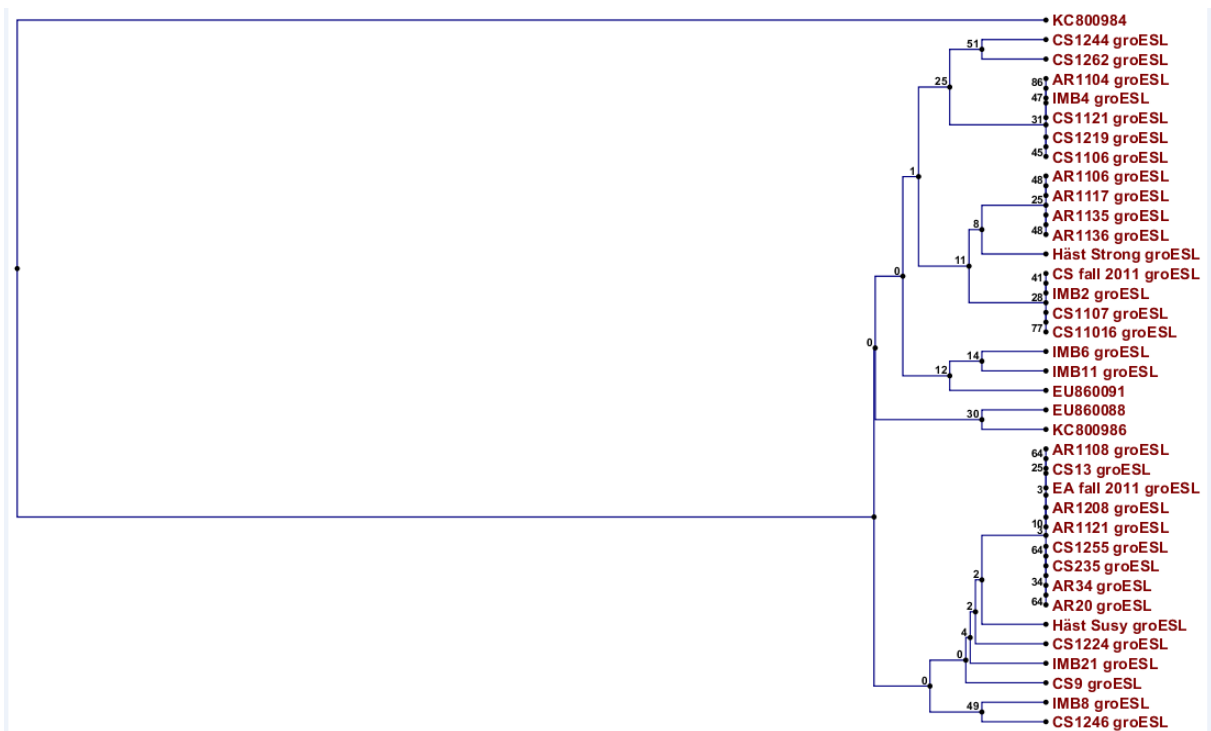


Fig 1. Sekvenser av groESLgenen för *Ap* från fästingar och sjukdomsfall hos lamm i studien, se vidare i text för besättningsidentitet CS, AR o s v, samt förklaringar för häst-, nöt- får- och älgisolat.

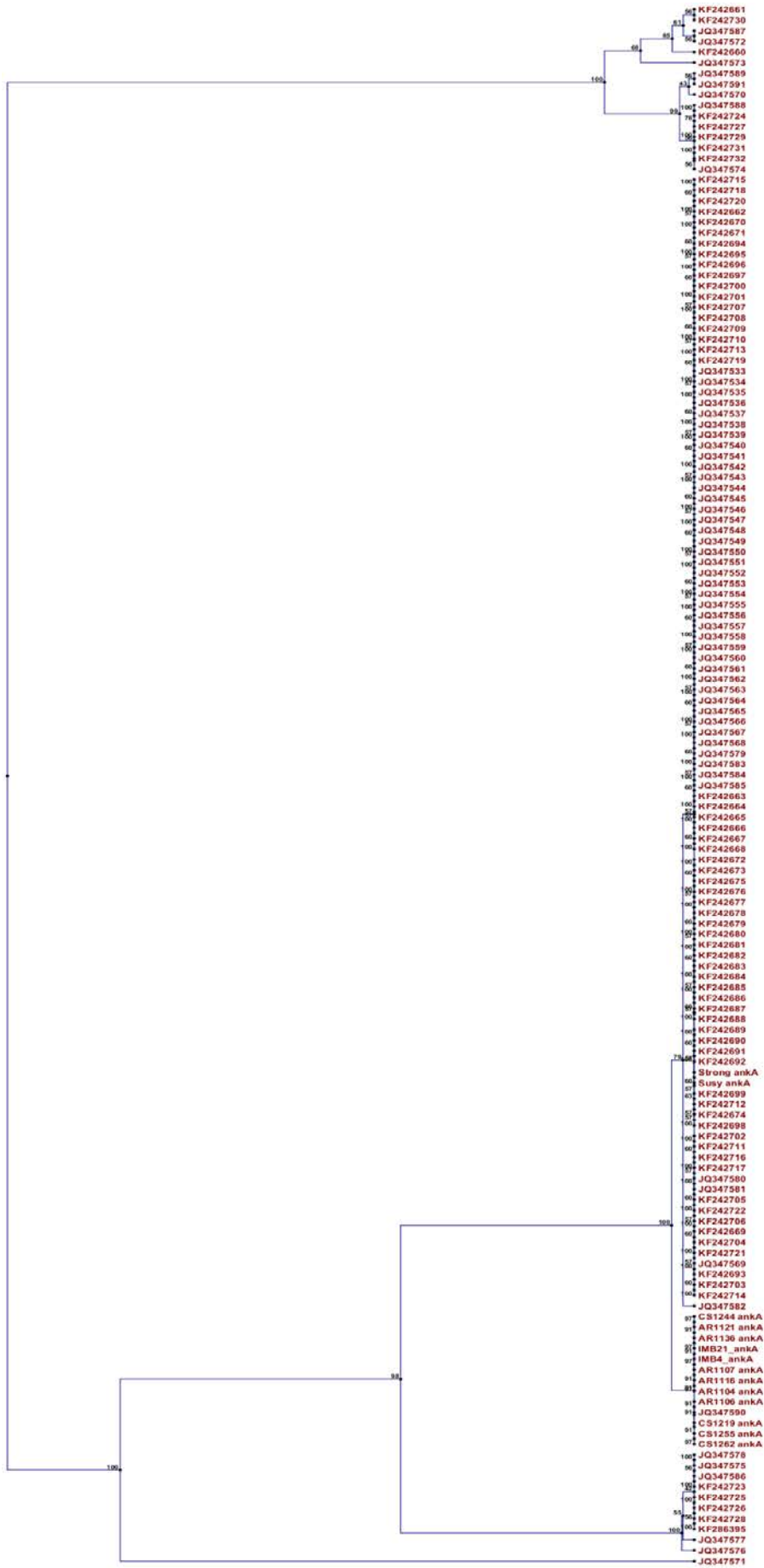


Fig 2. Sekvenser för tidigare publicerade ankAgenen av Huhn m. fl. (2014) Franzén m. fl. (2005) samt projektets, se vidare i text för besättningsidentitet CS, AR o s v.

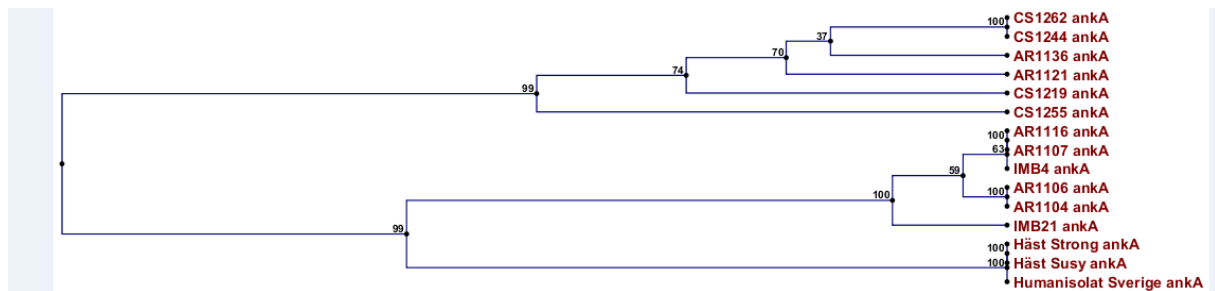


Fig 3. Jämförelse av sekvenser hos ankAgenen av A_p i fästingar som visar på variation inom och mellan studerade besättningar samt skillnaden från häst och humanisolat.