

Slutrapport-SLF

Epidemiologiska studier av den stora leverflundran på svenska betesmarker (H1050003)

Johan Höglund¹, Adam Novobilský¹, Katarina Gustafsson²

¹ Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sektionen för parasitologi (BVF), SLU, Uppsala

² Svenska Djurhälsovården (SvDhv), Länghem

1. Bakgrund

Den stora leverflundran *Fasciola hepatica* är en sjukdomsalstrande parasit som har ökat i betydelse under senare år i Sverige. Samtidigt som okulära fynd av flundror och skadade leverar har blivit vanligare vid slakt både av får och nötkreatur, har det saknats tillgång till moderna alternativa diagnostiska metoder. Även kunskaperna om parasitens epidemiologi under svenska förhållanden var bristfällig när detta projekt initierades.

Förlusterna på grund fasciolos orsakas dels av att skadade leverar kasseras i samband med slakten, dels genom minskad produktion, sjukdom och/eller dödsfall hos kraftigt drabbade djur. Även ökade veterinära kostnader och avmaskning leder till minskade intäkter för djurägaren.

Kunskaper om hur parasitens diagnosticeras och sprids är nödvändiga för att kunna optimera metoderna vid kontroll av fasciolos. Syftet med detta projekt var att: 1) etablera nya tekniker för diagnostik av den stora leverflundran hos olika värdjur, 2) fastställa vid vilken tidpunkt som får och nötkreatur infekteras, och 3) ta reda på i vilka snäckor som parasitens kan utvecklas. Det senare undersöktes dels i fält genom att jämföra av mottagligheten för *F. hepatica*-infektion hos olika svenska lymnaeider, dels under experimentella förhållanden.

2. Material och metoder

1.1. Studiedesign

Parasitens spridning till får och nötkreatur och hos olika potentiella mellanvärdar undersöktes vid återkommande tillfällen under åren 2011 och 2012. Sammanlagt valdes sex besättningar ut på basis av tidigare slaktfynd. Vid urvalet av gårdar lades även vikt vid att få tillgång till olika gårdar med varierande naturtyper på olika geografiska platser i landet.

Dynamiken i bildandet av antikroppar mot *Fasciola* i serum från djuren undersöktes med ELISA-teknik genom att vid upp till fyra tillfällen efter betessläpp analysera blodprover från kalvar respektive lamm. Detta gjordes för att uppskatta tidpunkten för när infektionen etablerades hos dessa djurslag. Dessutom insamlades snäckor såväl under vår som i början av hösten för att ta reda på den naturliga förekomsten av *F. hepatica*-infektion hos olika potentiella mellanvärdar. Även experimentella infektioner genomfördes med olika lymnaeida snäckor som påträffades allmänt på de undersökta gårdarna. Till dessa försök uppförökades snäckor som sedan exponerades individuellt för miracidier under laboratorieförhållanden. De olika snäckornas mottaglighet för *F. hepatica* och parasitens infektionsegenskaper kunde därmed jämföras mellan olika snäckarter.

1.2. Screening av *F. hepatica* antikroppar hos lamm och kalvar

Sera insamlades från mellan 15 och 20 lamm respektive kalvar vid mellan två och fyra på varandra följande undersökningstillfällen under åren 2011 och 2012. Provtagningarna av lammen genomfördes i huvudsak i juni, augusti och september-oktober, medan kalvarna undersöktes i juni, augusti / september och oktober / november. Antikropps nivåer uppmättes med en indirekt ELISA-metod i vilken exkretoriska / sekretoriska produkter från vuxna flundror användes som antigen. ELISA-

metoden utvecklades och validerades som en del av projektet enligt tidigare studier av Novobilský et al. (2007; 2012). Nivåerna av antikroppar uttrycktes som % av positivitet enligt följande formel: % positivitet = optisk densitet hos provet * 100 / optisk densitet i ett känt positivt prov. Gränsvärdet (positivitetsgränsen) för om ett djur skulle betraktas som infekterat eller ej grundades på ROC analys. Det visade sig att gränsen för ett positivt prov var 10 % hos får och 15 % hos nötkreatur.

1.3. Screening av *F. hepatica*-infektion hos olika snäckor

Olika lymnaeider och markbundna *Succinea* arter insamlades från betesmarkerna på de olika gårdarna både i maj och september år 2011 och 2012. Snäckorna plockades vid samtliga tillfällen i samma kvadranter med 20 min intervall och av samma person i enlighet med en tidigare studie (Malone et al., 1984). Snäckorna transporterades inom 24 timmar i 100 ml plastburkar till laboratoriet och sorterades efter skalmorfologin (Jackiewicz, 2000), varefter de frystes (-20 °C) för vidare undersökning. På grund den stora variationen hos skalerna, artbestämde vissa typiska snäckor även med en molekylär metod. Genomiskt DNA från minst en snäcka per skaltyp extraherades och användes vid PCR-sekvensering av den så kallade ”internal transcribed spacer- 2” (ITS2) regionen enligt Bargues et al. (2001). Erhållna sekvenser jämfördes med hjälp av BLAST verktyget med liknande sekvenser i GenBank varefter de erhållna sekvenserna deponerades i databasen.

Ett PCR-protokoll utvecklades även för undersökning av *F. hepatica* larver hos snäckorna. I metoden användes specifika primer-par (FH-ITS2-SPEC-F och FH-ITS2-SPEC-R) utvecklade av Kralova-Hromadova et al. (2008) som amplifierar en 112 bp lång sekvens i ITS2 genen hos *F. hepatica*. En mer detaljerad beskrivning kommer att presenteras i Novobilský et al. (2013). I korta drag så extraherades DNA från snäckornas mjukdelar med DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Tyskland) enligt tillverkarens anvisningar. Därefter undersöktes parasitförekomsten med PCR i samlingsprover från högst 10 individer per snäckart. PCR reaktionerna utfördes i en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) [10 min vid 95 °C följt av 5 min vid 72 °C, och därefter 40 cykler á 45 sekunder vid 95 °C, 1 min vid 55 °C och 1 min vid 72 °C]. Erhållna amplikon separerades på en 1,5 % agarosgel och färgades med GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA). Vid detektion av *F. hepatica* DNA i samlingsproven testades även de enskilda proverna i samma prov. Specificiteten för PCR-metoden jämfördes också med ett tidigare beskrivet protokoll baserat på amplifiering av ett fragment i cytokrom-C-oxidas subenhet 1 genen hos *F. hepatica* (Cucher et al., 2006).

1.4. Experimentell infektion av lymnaeida snäckor med *F. hepatica*

Totalt så etablerades laboratorie-kolonier av sex olika lymnaeida arter som sedan exponerades för parasiten experimentellt för att ta reda på deras känslighet mot *F. hepatica*. Omogna snäckor (1-2, 2-4, 4-6 mm) av *Galba truncatula*, *Lymnaea palustris*, *L. fuscus*, *L. glabra*, *L. stagnalis* och *Radix* sp. exponerades i dessa försök under några timmar för *F. hepatica* miracidier, varefter infektionsförloppet följdes hos de enskilda snäckorna som först föddes upp under konstanta förhållanden i plastlådor (Novobilský et al. 2013). Trettio dagar efter exponeringen (DPE) av *G. truncatula*, och efter 50 dagar DPE för övriga arter, överfördes snäckorna individuellt till 3,5 cm Petri-skålar. Därefter observerades snäckornas överlevnad och cercariernas svärmning varannan dag under ett antal veckor. Experimenten avslutades vid 65 respektive 95 DPE, varvid snäckorna mättes, dissekerades och antalet deponerade metacercariaer i skålarna räknades.

2. Resultat

2.1. Screening av antikroppar hos lamm och kalvar

Under 2011 var några lamm både från gård O1 och O2 svagt serologiskt positiva redan i juni. Samma lamm var dock negativa vid insamlingen av blod i augusti. Samtidigt serokonverterade fyra andra

lamm på O2 i augusti och dessa var fortsatt positiva även i oktober 2011. På O1 konverterade de flesta lammen först i september 2011 (figur 1). Däremot serokonverterade kalvarna på B1 och B3 inte förrän i november 2011 (figur 2). Även 2012 var flera lamm på O1 seropositiva vid provtagningen i juni, varefter antikropps nivåerna gradvis ökade under betesperioden. På O3 noterades tre svagt positiva lamm vid de första provtagningarna i juni och juli, men precis som på O1 och O2 var alla lamm negativa igen vid nästa provtagning i augusti. Den första "sanna" serokonversionen hos lammen på O3 noterades alltså inte förrän i augusti (figur 1). Under 2011 var dynamiken i bildandet av antikroppar hos nötkreaturen liknande som den som sågs 2012. Hos de allra flesta kalvarna inträffade serokonverteringen i november, förutom hos två B3 djur som konverterade i september (figur 2).

2.2. Screening av *F. hepatica*-infektion hos snäckor

Vid de fyra besöken på gårdarna identifierades fem olika arter inom familjen Lymnaeidae och en inom familjen Succineidae. Några arter delade livsmiljö och det var *G. truncatula* som var den vanligaste arten på de våta delarna av betesmarkerna följt av *L. palustris* och *Succinea* sp. Däremot hittades *L. fuscus*, *L. glabra*, och *Radix* spp. framför allt i djupa permanenta sötvattensamlingar. Totalt insamlades 1908 exemplar av *G. truncatula*, 837 *L. palustris*, 138 *L. glabra*, 130 *L. fuscus*, 93 *Radix* sp., och 42 *Succinea* sp. som även undersöktes med avseende på *F. hepatica* med PCR. *G. truncatula* var utan tvekan den art som var mest infekterade och ibland med en förekomst (prevalens) av *F. hepatica* på upp till 82 % (figur 3). Det första året (2011) påträffades positiva snäckor främst under hösten. År 2012 var däremot prevalensen av *F. hepatica* hos *G. truncatula* på vissa gårdar högre under våren än hösten (figur 3). Våren 2012 sågs ett samband mellan höga prevalenser såväl hos *G. truncatula* som hos lammen både på O1 och O2. Generellt sett var dock prevalensen av stora leverflundran hos *G. truncatula* inte korrelerad till den hos betesdjuren. För övrigt var endast ett exemplar vardera av *L. palustris* och *Succinea* spp. positiva för *F. hepatica*.

2.3. Experimentell infektion av lymnaeida snäckor med *F. hepatica*

Det visade sig att av de sex lymnaeida snäckor som exponerades för parasiten under laboratorieförhållanden var tre arter mottagliga för *F. hepatica*. Larvstadier av *F. hepatica* observerades dock aldrig hos *L. glabra*, *L. stagnalis* och *Radix* sp.. Däremot ledde exponeringen av *G. truncatula*, *L. palustris* och *L. fuscus* fram till utveckling av mogna cercarier som även lämnade snäckorna (svärmade) spontant. Infektionen skilde sig dock hos de olika arterna både i fråga om tiden fram till spontan svärmning av cercarier och gällande den totala produktionen av metacercarier. De olika infektionsparametrarna sammanfattas i tabell 2. Både hos *L. fuscus* och *L. palustris* blev dock inga snäckor i grupperna $\geq 2-4$ mm respektive $\geq 4-6$ mm infekterade. Hos båda dessa *Lymnaea* arter var det alltså bara möjligt att etablera infektionen hos unga (juvenila) individer (1-2 mm). Prevalensen av *F. hepatica* hos dessa snäckor var vidare bara 13 % hos *L. fuscus* och 51 % hos *L. palustris*. Däremot hos *G. truncatula* var alla åldersgrupper högggradigt smittade (eg. 90 % och 92 %). Hos dessa svärmade även cercariaerna spontant från ≥ 50 % med början av dag 43 PE.

3. Diskussion

I detta projekt undersöktes infektionsförloppet hos den stora leverflundran *F. hepatica* hos både får och nötkreatur för att ta reda på när djuren infekteras under svenska förhållanden. Fokus riktades även mot parasitens övervintringsförmåga och mottagligheten hos ett brett spektrum av olika tänkbara mellanvärdar.

I nordvästra Europa och med ett klimat som karakteriseras av måttliga vintertemperaturer, kan *F. hepatica* åtminstone teoretiskt sett övervintra på betet, antingen som embryonerade ägg, som metacercariaer och/eller i form av de larvstadier som finns i snäckor som fungerar som parasitens

mellanvärdar. När det gäller de allra tidigaste larvstadierna återupptas utvecklingen igen efter vinterperioden vid temperaturerna som överstiger 10 °C (Torgerson och Claxton, 1999). Parasitens dominerande övervintringsstrategi är alltså helt avgörande för vid vilken tidpunkten som djuren infekteras efter betesläpp. Det faktum att antikroppar mot *F. hepatica* kan påvisas med ELISA 2-4 veckor efter intag av metacerkariaer (Bossart et al., 2000; Mezo et al., 2007; Novobilsky et al., 2007), ger oss möjlighet att med hög precision uppskatta när infektionen etableras hos *F. hepatica*-naiva djur, dvs förstagångsbetande får och nötkreatur.

Enligt denna studie var flera lamm på gård O2 svagt serologiskt positiva redan vid den första provtagningen 2011. Eftersom antikropps nivåerna hos dessa djur omvandlades till negativa värden en och en halv månad senare, torde dessa djur dock inte ha varit smittade. De var snarare passiva mottagare av antikroppar i råmjölken (kolostrum) från sina mödrar. Förekomsten av tre svagt positiva lamm på gård O3 i juni och juli 2012 (figur 1) ger ytterligare stöd för denna hypotes. I detta fall vet vi dessutom att lammen var födda av två tackor som var seropositiva hösten 2011 (Novobilsky et al., 2012). Även det faktum att de flesta lamm som var helsyskon hade liknande antikropps nivåer styrker idén om passiv överföring av anti-*Fasciola* antikroppar med råmjölken. Detta gäller även alla syskon på gård O3 som hade mer eller mindre identiska antikropps nivåer i juni. Överföring av *Fasciola* antikroppar med kolostrum har tidigare beskrivits hos kalvar av Mezo et al. (2010), och som anger att de var detekterbara upp till 12 veckor efter födseln. Utifrån våra resultat kan vi dra slutsatsen att *Fasciola* antikroppar i kolostrum kan hittas hos lammen åtminstone upp till 11 veckor efter födseln. Därmed är serologisk diagnostik av fasciolos hos lamm under denna period direkt olämplig eftersom det finns stor risk för falskt positiva svar.

Förutsatt att antikroppar överförs med råmjölken kan vi dra slutsatsen att lammen i detta fall blev infekterade tidigast i början av augusti 2011. Både på gård O1 och O2 observerades dock höga seroprevalenser 2012. Sammanlagt 70-80 % av lammen hade detta år serokonverterat i juni. Eftersom positiviteten var hög redan i juni, samtidigt som inga djur var negativa i augusti 2012, tolkar vi det som om att dessa lamm infekterades tidigt under betesperioden någon gång mellan slutet av maj och början av juni under 2012. Samtidigt är det omöjligt att utesluta passiv överföring av antikroppar som orsak till den seropositivitet som noterades i juni. Antikropps bildning efter infektion sannolikt i kombination med passiv överföring av antikroppar i kolostrum, förklarar de höga prevalenser som observerades i juni både på O1 och O3. Dynamiken i bildandet av de antikroppar som noterades på O1 och O2 motsvarar i stort sett den som kan ses hos experimentellt infekterade får och nötkreatur (Phiri et al., 2006). Detta understryker att lamm på vissa gårdar sannolikt blev smittade med utvecklingsstadierna av *F. hepatica* som övervintrat på betet.

Däremot kunde vi inte påvisa någon passiv överföring av antikroppar med kolostrum hos nötkreatur. Det bör dock betonas att det av praktiska skäl var omöjligt att samla in serum i juni på en av gårdarna med nötkreatur. Vid en jämförelse av antikropps nivåerna hos de båda djurslagen förefaller det vidare som om det humoral immunsvaret mobiliserades senare hos kalvarna än hos fåren. När det gäller nötkreatur tyder alltså det mesta på att djuren på B1 och B3 smittades någon gång mellan september och slutet av oktober.

Av resultaten från denna studie framgår att *G. truncatula* är den viktigaste vektorn för *F. hepatica* i Sverige. Det är även uppenbart att både *L. palustris* och *L. fuscus* är mottagliga för *F. hepatica* men att dessa arter samtidigt uppvisar tecken på åldersresistens (Novobilský et al., under bearbetning). De sporadiska fynden av *F. hepatica* som gjordes hos *L. palustris* och *Succinea* sp. avspeglar det faktum att dessa arter lever i samma livsmiljö som *G. truncatula*. Även om det sedan tidigare var känt från experimentella studier att *L. palustris* är mottaglig för *F. hepatica* (Degueurce et al., 1999; Kendall, 1950), är vårt fynd det första som visar på en naturlig etablering hos denna snäcka (Novobilský et al.,

2013). Naturlig infektion av *Succinea* sp. med *F. hepatica* har tidigare rapporterats från Irland (Relf et al., 2009). Uppgifter om parasitens etablering och överlevnad hos denna art i Sverige kräver ytterligare utredning.

Förekomsten av *F. hepatica* hos *G. truncatula* varierade ofta stort mellan de båda åren, samt olika säsonger och lokaler. En intressant iakttagelse var att samtliga *G. truncatula* i nötkreatursbesättning B3 var negativa samtidigt som prevalensen hos kalvarna varierade mellan 53 - 81 %. Däremot påträffades flera positiva *G. truncatula* snäckor i nötbösättning B2 och med ett bete som liknade det i färbesättning O2, både vad gäller storlek och naturtyp. Sannolikheten för att påträffa positiva snäckor är naturligtvis kopplat både till snäcktätheten och betesintensiteten som var varierade på de undersökta betesmarkerna. Att andelen infekterade respektive snäckor är starkt förknippad med populationstätheten hos snäckorna i olika habitat påtalades redan av Ross (1977) och Smith (1981). Ur diagnostisk synvinkel är det trots allt viktigt att påtala att undersökning av snäckor aldrig kan ersätta andra metoder som koproskopi och/eller serologi när man vill uppskatta graden av infektionen hos olika betesdjur.

Utvecklingen återupptas igen på våren när temperaturen överstiger 10 °C. Ollerenshaw (1959) myntade begreppen "vinterinfektion" respektive och "sommarinfektion" vid studier av leverflundrans livscykel i Storbritannien. Vid "vinterinfektion" blir övervintrande snäckor exponerade för miracidier under senhösten, varefter djuren smittas med nybildade metacercarier tidigt under våren/försommaren. Kännetecknande för "sommarinfektion" är att snäckorna infekteras tidigast i maj, varvid produktionen av metacercariaer påbörjas någon gång i augusti. I den aktuella studien konstaterades att såväl "vinterinfektion" som "sommarinfektion" förekommer i Sverige. Höga förekomster av *F. hepatica* hos *G. truncatula* upptäcktes våren 2012, men bara på betesmarkerna till O1, O2 och B2. På grund av att snäckorna samlade in under första halvan av maj, och eftersom medeltemperaturen på dessa orter aldrig översteg 8 °C i april 2012 (www.smhi.se), saknades möjligheter för äggens att utvecklas under vårvintrarna (Ollerenshaw, 1971). Övervintring av *F. hepatica* hos snäckorna är följaktligen den troligaste förklaringen i dessa fall. Eftersom typisk "vinterinfektion" endast observerades 2012 och bara på gård O1 och O2, förefaller det som om "sommarinfektion" är den vanligaste övervintringsstrategin under svenska förhållanden. Detta överensstämmer med liknande Nordeuropiska studier (Ross, 1977; Shaka och Nansen, 1979). Vilka faktorer som predisponer för "vinterinfektion" respektive "sommarinfektion" är oklart, även om det med största sannolikhet har att göra med lokala väderleksförhållanden.

Övervintrande metacercarier på betet tycks alltså spela en underordnad roll i epidemiologin hos *F. hepatica* i norra Europa (Torgerson och Claxton, 1999). Detta överensstämmer med våra observationer på O3. I denna besättning behandlades hela besättningen med triklabendazol under vintern 2011/2012 och då en 100 % behandlingseffektivitet dokumenterades (Novobilsky et al., 2012). Betena på O3 blev följaktligen inte kontaminerade med ägg från tackorna under våren 2012. Av antikroppsreaktionen att döma är det uppenbart att de *F. hepatica*-naiva lammen infekterades tidigast i början av augusti 2012. Om vi räknar med att larvutvecklingen hos *G. truncatula* tar cirka två månader vid normala sommartemperaturer (Ollerenshaw, 1971), var infektion med metacercarier från snäckor som i sin tur blev infekterade med övervintrade ägg i maj, den troligaste förklaringen till överföringen av parasiten till lammen.

Sammanfattningsvis kan vi mot bakgrund av denna epidemiologiska undersökning utarbeta förslag både till diagnos och för kontroll av fasciolos i Sverige. Prov för traditionell träckprovundersökning och/eller koproantigen ELISA bör tas från de förstagångsbetande djuren tidigast i oktober (optimalt i november). Vid serologisk diagnos bör blodproverna undersökas tidigast i september när de tas från lammen och något senare vid undersökning av kalvar. Hos får och nötkreatur som är äldre än ett år kan

träckprover och blodprover med fördel tas året runt, även om sannolikheten för att finna parasiten ökar under hösten och vintern. För utvärdering av behandlingseffekter, är mätning av antikroppar med ELISA en direkt värdelös metod eftersom antikropparna finns kvar i blodcirkulationen upp till minst en månad vid en framgångsrik behandling (Novobilsky et al., 2012). Som alternativ rekommenderas istället olika koprologiska metoder där man antingen letar efter äggen eller påvisar parasitantigen (sk. koproantigen).

Även behandlingsstrategier med sk, flukicider kan rekommenderas mot bakgrund av resultaten från denna studie. Eftersom albendasol (Valbazen[®]) endast har effekt mot vuxna flundror föreslås att tackor ska avmaskas tidigast från slutet av oktober eller 2 månader efter påbörjad dräktighet. I besättningar med återkommande problem rekommenderas dessutom en andra avmaskning med albendasol innan betessläpp. Triklabendazol (Fasinex[®]) har effekt även mot parasitens tidiga utvecklingsstadier och är det bästa valet i hårt drabbade besättningar. Exempelvis när man vill förhindra akut fasciolos under sommaren och tidig höst. Triklabendazol får dock bara användas efter särskilt tillstånd och ska användas med försiktighet då det finns dokumenterad risk för resistensutveckling. Det måste dock betonas att dessa avmaskningsstrategier kräver ytterligare utredning. Det saknas även basal kunskap om avmaskning av den stora leverflundran i mjölkkobesättningar.

Referenser

- Bargues, M.D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R.A., Pointier, J.P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C., Mas-Coma, S., 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect. Genet. Evol.* 1, 85–107.
- Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux, T., Protz, M., Lonneux, J.F., Losson, B., 2000. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 87, 103–123.
- Cucher, M.A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbe, J.H., Wisnivesky-Colli, C., 2006. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet. Parasitol.* 137, 74–82.
- Degueurce, F., Abrous, M., Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Gevrey, J., 1999. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the prevalence of natural or experimental infections in four species of freshwater snails in eastern France. *J. Helminthol.* 73, 197–202.
- Jackiewicz, M., 2000. *Blotniarki Europy (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae)*. Wydawnictwo Kontekst, Poznan.
- Kendall, S.B., 1950. Snail hosts of *Fasciola hepatica* in Britain. *J. Helminthol.* 24, 63–74.
- Kralova-Hromadova, I., Spakulova, M., Horackova, E., Turcekova, L., Novobilsky, A., Beck, R., Koudela, B., Marinculic, A., Rajskey, D., Pybus, M., 2008. Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda : Fasciolidae): Intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 94, 58–67.
- Malone, J.B., Loyacano, A.F., Hughjones, M.E., Corkum, K.C., 1984. A 3-year study on seasonal transmission and control of *Fasciola hepatica* of cattle in Louisiana. *Prev. Vet. Med.* 3, 131–141.
- Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Carro, C., Ubeira, F.M., 2010. Kinetics of anti-*Fasciola* IgG antibodies in serum and milk from dairy cows during lactation, and in serum from calves after feeding colostrum from infected dams. *Vet. Parasitol.* 168, 36–44.
- Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M., Ubeira, F.M., 2007. The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.* 93, 65–72.
- Novobilsky, A., Averpil, H.B., Høglund, J., 2012. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 190, 272–276.
- Novobilsky A., Kašný M., Beran L., Rondelaud D., Høglund J. 2013. *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Parasites and Vectors*, submitted.
- Novobilsky, A., Kasny, M., Mikes, L., Kovarcik, K., Koudela, B., 2007. Humoral immune responses during experimental infection with *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in goats and comparison of their excretory/secretory products. *Parasitol. Res.* 101, 357–364.
- Ollerenshaw, C.B., 1959. The ecology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Vet. Rec.* 71, 957–963; 963–965.
- Ollerenshaw, C.B., 1971. Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *Vet. Rec.* 88, 152–164.

- Phiri, I.K., Phiri, A.M., Harrison, L.J.S., 2006. Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Vet. Parasitol.* 141, 234–242.
- Relf, V., Good, B., McCarthy, E., de Waal, T., 2009. Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family Succineidae in Ireland. *Vet. Parasitol.* 163, 152–155.
- Ross, J.G., 1977. 5-year study of epidemiology of fascioliasis in N, E and W of Scotland. *Brit. Vet. J.* 133, 263–272.
- Shaka, S., Nansen, P., 1979. Epidemiology of fascioliasis in Denmark - Studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages overwintering on pasture. *Vet. Parasitol.* 5, 145–154.
- Smith, G., 1981. A 3-year study of *Lymnaea truncatula* habitats, disease foci of fascioliasis. *Brit. Vet. J.* 137, 398–410.
- Torgerson, P., Claxton, J., 1999. Epidemiology and control, In: Dalton, J.P. (Ed.) *Fasciolosis*. CABI Pub, Wallingford, pp. 113–149.
- www.smhi.se_Sveriges meteorologiska och hydrologiska institute (accessed on 2013-05-16)
<http://www.smhi.se/klimatdata/meteorologi/2.1353/monYrTable.php?month=4&par=tmp>

Publikationer inom projektet

I internationella tidskrifter med peer review

- Novobilský A., Kašný M., Beran L., Rondelaud D., Höglund J. *Lymnaea palustris* and *Lymnaea fuscus* are potential but uncommon intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Parasites and Vectors*, submitted.
- Novobilský A., Engström A., Sollenberg S., Gustafsson K., Höglund J. Transmission patterns of *Fasciola hepatica* in Sweden. *Veterinary Parasitology*, in preparation.
- Novobilský A., Averpil H.B., Höglund J., 2012. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology* 190, 272–276.
- Rondelaud D., Novobilský A., Höglund J., Kašný M., Pankrác J., Vignoles P., Dreyfuss G., 2013. Growth rate of the intermediate snail host *Galba truncatula* influences redial development of the trematode *Fascioloides magna*. *Journal of Helminthology*, in press.
- Sanabria R., Mouzet R., Pankrác J., Djuikwo Teukeng F.F., Courtioux B., Novobilský A., Höglund J., Kašný M., Vignoles P., Dreyfuss G., Rondelaud D., Romero J., 2013. *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix*, potential intermediate hosts for *Fascioloides magna*. *Journal of Helminthology*, in press, DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X12000582>
- Novobilský A., Kašný M., Pankrác J., Rondelaud D., Engström A., Höglund J., 2012. *Lymnaea fuscus* (Pfeiffer 1821) as potential intermediate host of *Fascioloides magna* in Europe. *Experimental Parasitology* 132, 282–286.

Populärvetenskap riktad till veterinärer och djurägare

- Novobilský A., Christensson D., König U., 2012. Stora leverflundran i fokus runt mötesbordet. *Svensk Veterinärtidning* 14, 26–29.
- Novobilský A., Höglund J., 2011. Leverflundra är svår att diagnostisera. *Nötkött* 3, 51.

Konferensbidrag

- Averpil H.B., 2013. Stora leverflundran hos får. Fåravelsförbundets stämma i Tylebäck-Halmstad, May 18.
- Höglund J., 2013. Parasitologi i praktiken. Svenska Djurhälsovårdens vårkonferens, Västerås, 12-13 mars.
- Novobilský A., 2012. Fasciolosis in Sweden. The Research Day for the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, February 7th.
- Novobilský A., Averpil H.B., Höglund J., 2012. Control of ovine fasciolosis in Sweden. The proceeding of the Veterinary Congress, Uppsala, Sweden. November 8-9th.
- Novobilský A., Averpil H.B., Höglund J., 2012. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. Proceeding of 10th Czech and Slovakian Parasitological Days, Brno, Czech Republic, May 28th – June 1st 2012, 89.
- Novobilský A., Gustafsson K., Höglund J., 2011. *Fasciola hepatica* in Sweden. Svenska Djurhälsovårdens vårkonferens, Skövde, March.

Novobilský A., Gustafsson K., Höglund J., 2011. Intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in Sweden. The Proceedings of 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Buenos Aires, Argentina, August 21-25th.

Presentationer för rådgivare och djurägare

Averpil H.B., 2013. Stora leverflundran hos får. Fåravelsförbundets stämma i Tylebäck-Halmstad, 18 maj.

Gustafsson, K. 2012. Senaste nytt om fårens parasiter, Ljungstorp, 25 januari.

Gustafsson, K. 2012. Senaste nytt om fårens parasiter, Rångedala, 1 mars.

Gustafsson, K. 2012. Senaste nytt om fårens parasiter, Uddevalla 19 mars.

Gustafsson, K. 2012. Parasiter hos lantbrukets djur, SLU, Skara 7 maj.

Höglund, J. 2012. Parasitkväll på Orust, Tegneby, 4 april.

Höglund, J. 2012. Betesparasiter. Jordbruksverket, 12 september.

Höglund, J. 2012. Parasiter hos nötkreatur, EPOK, Mjölby 11 april.

Gustafsson, K. 2013. Stora leverflundran. Arbetsdag med länsstyrelsen i Västra Götaland, Herrljunga 20 mars.

Projektet har också bidragit till utgivningen av två informationsbroschyrer om leverflundra till får och nötkreatur

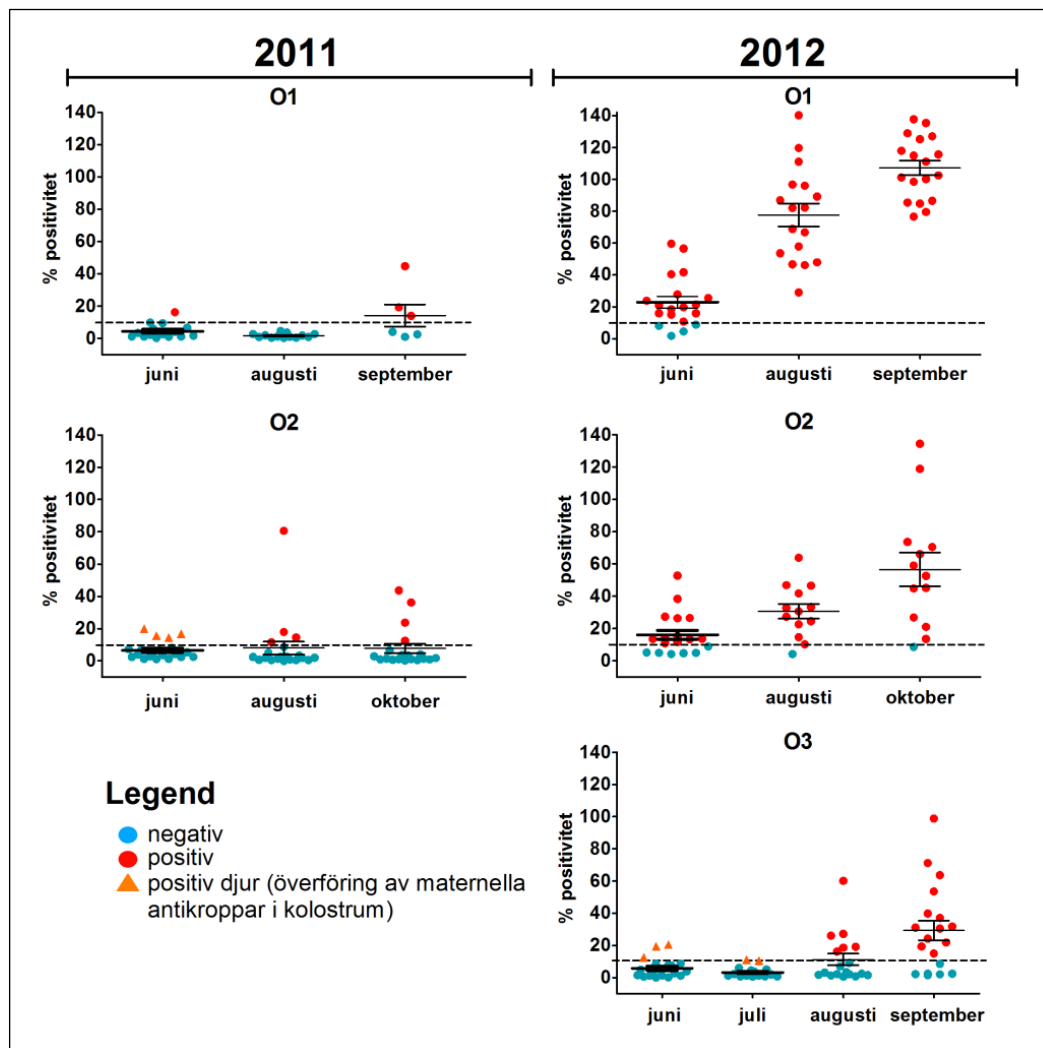
Tabell 1. Beskrivning av de undersökta besättningarna och deras betesmarker

Gård	Koordinater	Art	Korsning	Antal vuxna djur	Betesareal (Ha)	Betestyp
O1	58°05'21"N, 12°13'33" E	får	Texel, Leicester, Gotland	90	22	Naturbetesmark belägen i en dalgång, utan träd men med viss buskvegetation. En å passerar längs ena kanten av hagarna som i övrigt var omgivna av ett dräneringsdike, som periodvis var översvämmat
O2	59°17'13" N, 14°58'44" E	får	Gotland, Texel	120	80	Betesmark belägen i ett naturreservat, och som hade skapats genom att hugga ned av blandskog för fem år sedan. Två diken korsade hagen
O3	57°28'35" N, 11°56'27" E	får	Gotland	78	31	Kustnära naturbetesmark på den svenska västkusten, och där de inre delarna periodvis var översvämmade med sötvatten, och de yttre delarna av havsvatten
B1	58°36'59" N, 16°22'40" E	nöt	Charolais x Red Angus korsning	85	200	Fyra väl separerade beteshagar, varav tre gränsade mot en sjö. Kantzonen mellan sjön och själva betesmarken karakteriserades av vassvegetation. Betesområdet hade dessutom en damm och flera dräneringsdiken
B2	59°08'40" N, 14°49'36" E	nöt	Charolais	24	32	Betesområde beläget i ett kuperade landskap med flera våtområden och dräneringsdiken
B3	56°04'36" N, 14°06'56" E	nöt	Red Angus x Black Angus korsning	90	90	Två separerade betesmarker, varav den första var på plan yta omgiven av ett fält, medan den andra bestod av ett kärrområdet längs en å
B4	58°27'47" N, 15°33'42" E	nöt	Aberdeen Angus x Simental korsning	115	260	Strandnära betesmarker som periodvis var översvämmade belägna vid sjön Roxen, som är en typisk näringsrik slättsjö

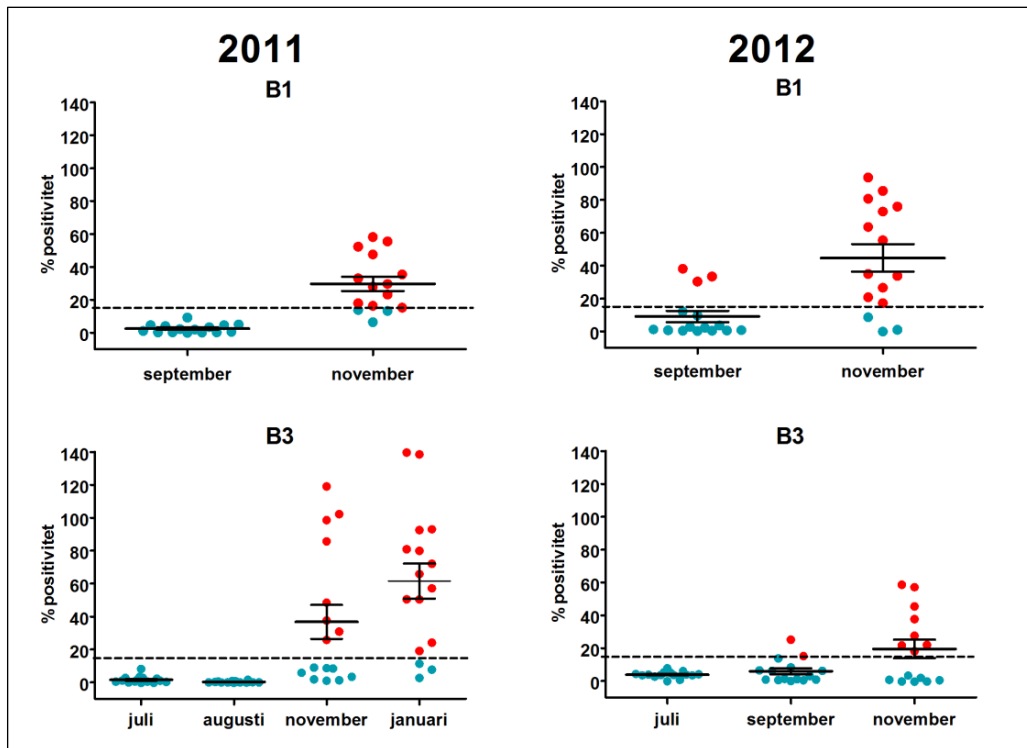
Tabell 2. Egenskaper hos *Galba truncatula*, *Lymnaea palustris* och *L. fuscus* experimentellt infekterade med *Fasciola hepatica*

	<i>Lymnaea fuscus</i>	<i>Lymnaea palustris</i>	<i>Galba truncatula</i>	
Skalstorlek på dagen för exponering	1-2 mm	1-2 mm	1-2 mm	> 2-4 mm
Förekomst av <i>F. hepatica</i> infektion	13.0%	51.3%	89.5%	91.9%
Antalet infekterade snäckor (CS + NCS)	9	40	51	68
Antal sniglar med cercariae svärmning (CS) / sniglar utan cercarial svärmning (NCS)	1/8	17/23	34/17	59/9
Första observation för cerceria svärmning (dag efter exponering)	68	61	46	43
Genomsnittlig antal spontant svärmande cercariaer per CS snäcka ± SD	0 ^a	18±23 ^a	103±80 ^b	130±102 ^b
Totalt antal metacercariae i alla CS snäckor	18	348	3619	7952
Genomsnittlig antal MC NCS snigel (± SD) vid dissektion (efter krossning)	157±58	165±51	269±114	299±88

Figur 1. Dynamiken i bildandet av antikroppar mot *F. hepatica* hos lammen på O1, O2, O3 under 2011 och 2012.



Figur 2. Dynamiken i bildandet av antikroppar mot *F. hepatica* hos kalvarna på B1 och B3 under 2011 och 2012.



Figur 3. Förekomsten av *F. hepatica* infektion hos *Galba truncatula* på alla 7 gårdar under åren 2011 och 2012. V = vår, H = höst.

